

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 16 SEP 2003

WIPO PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 07 793.6

Anmeldetag: 24. Februar 2003

Anmelder/Inhaber: PROFOS AG, Regensburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis und zur Entfernung von
Endotoxin

IPC: C 12 Q 1/25

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 28. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag


Stremme

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Abreicherung von Endotoxinen aus einer Probe.

24. Februar 2003

Neue deutsche Patentanmeldung
Anmelder: PROFOS AG
Unser Zeichen: PRO-008/1

5 Verfahren zum Nachweis und zur Entfernung von Endotoxin

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und zur Abreicherung von 10 Endotoxinen aus einer Probe.

Endotoxin (ET) bezeichnet eine Familie von Lipopolysacchariden, die zusammen mit Proteinen und Phospholipiden die äußere Zellwand Gram-negativer Bakterien bilden. Endotoxine kommen ausschließlich in dieser Bakteriengruppe vor und spielen eine wichtige Rolle in der Organisation, Stabilität und Barrierefunktion der äußeren Membran. Zahlreiche Bakteriophage nutzen Endotoxin bzw. allgemein Lipopolysaccharid zur spezifischen Erkennung ihrer Wirtsbakterien.

Alle Endotoxinvarianten bestehen aus einem Heteropolysaccharid, das kovalent an Lipid A gebunden ist (Holst, O., 1999, Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In: Endotoxin in health and disease (Brade, H., Morrison, D.C., Opal, S., Vogel, S. eds.); Marcel Dekker Inc. New York)). Lipid A verankert Endotoxin in der äußeren Bakterienmembran. Das Heteropolysaccharid, das aus einem Herzoligosaccharid und dem O-Antigen besteht, zeigt in die umgebende Lösung und bestimmt die serologische Identität des Bakteriums. Das O-Antigen besteht aus repetitiven Oligosaccharideinheiten, deren Zusammensetzung stammspezifisch ist (siehe hierzu Holst et al., supra). Charakteristische Bausteine des Herzoligosaccharids sind 2-Keto-3-desoxyoctonsäure (KDO) und L-Glycero-D-manno-heptose (Hep).

Der konservativste Teil von Endotoxin verschiedener Gattungen ist das Lipid A. Ähnlich konserviert wie Lipid A ist die innere Herzregion, die äußere Herzregion weist bereits eine höhere Variation auf. Die innere Herzregion, KDO und Lipid A selbst tragen mehrere Phosphatgruppen als Substituenten und sind so für die negative Ladung von Endotoxin verantwortlich. Darüber hinaus können die Phosphatgruppen am Lipid A und der Herzregion variabel mit Arabinose, Ethanolamin und Phosphat substituiert sein. Einzelne Saccharidbausteine des O-Antigens sind acetyliert, sialyliert oder glycosyliert. Das O-Antigen variiert außerdem bezüglich der Anzahl repetitiver Einheiten, weshalb die Endotoxin-Population jedes Bakteriums eine gewisse Heterogenität aufweist (Palva E.T., Makela P.H., Lipopolysaccharide heterogeneity in *Salmonella typhimurium* analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel

electrophoresis. Eur J Biochem. 1980;107(1):137-43; Goldman R.C., Leive L., Heterogeneity of antigenic-side-chain length in lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111 and Salmonella typhimurium LT2., Eur J Biochem. 1980;107(1):145-53).

5 Endotoxine sind Biomoleküle, die ohne entsprechende Vorsichtsmaßnahmen in praktisch allen wässrigen Lösungen vorzufinden sind. Endotoxine können bei Mensch und Tier zu Sepsis, einer starken Fehlreaktion des Immunsystems führen. Daher sind z.B. bei der Herstellung von Pharmaproteinen Verunreinigungen mit Endotoxin exakt nachzuweisen und in der Folge komplett zu entfernen. Endotoxin stellt ein Problem bei gentechnisch hergestellten 10 Arzneimitteln, Gentherapeutika oder Substanzen dar, die in Mensch oder Tier (z.B. Tierärztliche Behandlung oder bei Tierversuchen) injiziert werden. Doch nicht nur bei medizinischen, sondern auch bei Forschungsanwendungen, wie bei Transfektionsexperimenten von Säugerzellen kann eine Hemmung bzw. ein Senken der Transfektionseffizienz durch Endotoxin beobachtet werden.

15 Um Proteine im Rahmen von klinischen Studien einsetzen zu können, verlangen die europäische und die amerikanische Pharmacopeia, dass die Proteine bestimmte Grenzwerte an Endotoxinbelastung unterschreiten (z.B. Immunserum Globulin 0,91 EU/ml, dies entspricht 5 EU/kg Körpergewicht & Stunde (Dosis = EU/kg * h); EU = Endotoxin Unit; FDA (Food and 20 Drug Administration): Guideline on Validation of LAL as End Product). Falls ein Medikament bzw. darin enthaltene Proteine eine zu hohe Endotoxinbelastung aufweisen, kann dies bis zum Tod des Probanden führen. Die fehlgeleitete Immunabwehr schädigt durch eine Überreaktion den Patienten. Dies kann zu Gewebeentzündungen, Blutdruckabfall, Herzrasen, Thrombose, Schock etc. führen. Bereits eine länger anhaltende Endotoxin-Exposition in Picogramm-Mengen kann zu chronischen Nebenwirkungen wie z.B. Immunschwächen, septischen Symptomen etc. 25 führen. Im Rahmen der Substanzherstellung wird daher, insbesondere bei Prozessen unter „Good Manufacturing Practice“ (GMP) Bedingungen, versucht, Endotoxin soweit wie möglich abzureichern. Allerdings ist die Endotoxin-Entfernung bei Proteinen, Polysacchariden und DNA problematisch. Gerade bei Proteinen gibt es große Probleme durch deren intrinsische 30 Eigenschaften wie Ladungszustand oder Hydrophobizität, die eine Endotoxinentfernung nahezu verhindern bzw. zu großen Produktverlusten bei der Entfernungsprozedur führen können.

Derzeit sind nur drei Verfahren zum Endotoxin-Nachweis in biologischen Lösungen beschrieben, wobei nur die beiden ersten Verfahren von der FDA zugelassen sind: 1. „Rabbit

Pyrogen Testing“: Ein Verfahren, bei dem einem lebenden Kaninchen eine Endotoxin-Lösung injiziert und damit eine Immunreaktion ausgelöst wird. Diese Endotoxin-verursachte Immunantwort wird über die Entwicklung von Fieber nachgewiesen. 2. Deutlich besser standardisierbar ist der „Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)“ – Test, der derzeit am häufigsten verwendete Test (BioWhittaker, Inc., Charles River, Inc., Associates of Cape Cod, Inc., alle USA). Bei diesem Verfahren wird die Verklumpung des Blutes des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) nach Endotoxin-Kontakt gemessen. 3. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz eines speziellen Zellkultursystems (Sterogene Inc., USA), mit dem die Aktivierung von Monozyten über die Entstehung bestimmter Zytokine verfolgt wird.

10 Die beiden erstgenannten Verfahren sind jedoch sehr teuer (vgl. Konkurrenzvergleich Endotoxin-Nachweis) und durch den großen Bedarf an Versuchstieren bzw. an Blut des sehr seltenen Pfeilschwanzkrebses nicht zuletzt aus Tierschutzgründen bedenklich. Der LAL-Test kann zwar auch miniaturisiert und automatisiert werden, hat aber aufgrund geringer Stabilität der 15 Komponenten massive Nachteile in der Anwendung. Eine einmal geöffnete LAL-Lösung muss direkt weiterverarbeitet und aufgebraucht werden, da die Komponenten innerhalb weniger Stunden aggregieren. Für alle Testverfahren ist geschultes Personal nötig und die Verfahren sind sehr störanfällig, weil z.B. das Immunsystem von Kaninchen auf die gleiche Endotoxindosis 20 durchaus unterschiedlich reagieren kann. Das Zellkultur-Verfahren der Firma Sterogene ist, wie alle Zellkulturverfahren, ebenfalls sehr aufwändig und weist Probleme bei der Standardisierung auf.

25 Insgesamt kann festgestellt werden, dass es kein einfach handhabbares kostengünstiges Verfahren zum Endotoxinnachweis gibt und die derzeit eingesetzten Methoden eine Reihe von Nachteilen aufweisen. Es besteht daher der Bedarf für ein Verfahren, das diese Nachteile umgeht.

Zur Endotoxinabreicherung aus biologischen Lösungen allgemein gibt es eine Reihe von Verfahren. Insbesondere bei Proteinen gibt es allerdings bislang keine allgemein anwendbaren 30 Standardverfahren. Die jeweils verwendeten Verfahren sind angepasst an die spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Proteins und auf den entsprechenden Produktionsprozess des Proteins. Es gibt verschiedene Möglichkeiten zur Endotoxinabreicherung, wobei jedes dieser Verfahren spezifische Vor- und Nachteile aufweist.

Die Ultrafiltration (Petsch, D. & Anspach, F.B., 2000, J. Biotechnol. 76, 97-119 und Referenzen darin) wird für Endotoxin-Abreicherungen aus Wasser und Lösungen mit niedermolekularen Bestandteilen wie Salze, Zucker und Antibiotika verwendet, ist jedoch nicht für hochmolekulare Proteine oder DNA geeignet.

5

Die 2-Phasen-Extraktion (z.B. WO 0166718, Merck) soll wasserlösliche Proteine und DNA von Endotoxin trennen, bedingt jedoch Detergenzreste im gereinigten Produkt. Das Verfahren ist außerdem durch mehrmaliges Wiederholen der Reinigungsprozedur zeitaufwendig.

10 Ebenfalls wird für die Endotoxinabreicherung aus DNA und basischen Proteinen ein Anionenaustauscher (DEAE)-Verfahren verwendet (z.B. US 5990301, Qiagen; WO 9414837, Enzon), das jedoch eine niedrige Ionenstärke (<50 mM NaCl) voraussetzt und zu einer Protein Co-Adsorption bei sauren Proteinen führt.

15 Ein weiteres Verfahren zur Endotoxinabreicherung aus DNA und Proteinen (z.B. BSA, Myoglobin, gamma-Globulin, Cytochrom C) ist die Affinitäts-Adsorption (z. B. Polymyxin B, Histamine, Histidin, Polylysin) z.B. GB 2192633 (Hammersmith Hospital), die jedoch im Fall von Polymyxin B toxisch ist und bei niedrigen Ionenstärken zur Co-Adsorption von Proteinen führen kann.

20 Weiterhin wird die Immun-Affinitäts-Chromatographie eingesetzt, wobei die Spezifität für bestimmte Endotoxine nur über teure Antikörper (US 5179018, Centocor; WO 0008463, Bioserv) gegen Herz-Oligosaccharid erreicht werden kann.

25 Ferner wird das S3delta-Peptid (WO 0127289) des Faktors C (eines Bestandteils des LAL-Tests) (WO 9915676 beide: National University of Singapur) bei Proteinen (z.B. BSA, Chymotrypsinogen) verwendet, wobei jedoch dieses Verfahren eine geringe Effizienz bei hohen Ionenstärken besitzt und die hohen Herstellkosten (Produktion in Insekten-Zellkultur) hinzukommen.

30 In der Anwendung in der pharmazeutischen Industrie befinden sich für Proteinlösungen, angepasst an die Eigenschaften der Zielproteine im wesentlichen drei Verfahren:

- Anionenaustauscherchromatographie
- Reversed-Phase Chromatographie; Diese hat den Nachteil, dass sie nicht für alle Proteine

gleichermaßen geeignet, - insbesondere bei hydrophoben Proteinen problematisch ist. Darüberhinaus ist dieses Verfahren sehr zeitintensiv.

- RemTox (Fa. Millipore): Dieses Verfahren hat den Nachteil, das neben einer sehr langen Inkubationsdauer, der unspezifische Bindungsanteil hoch ist, und die Proteinwiederfindung oftmals nicht ausreichend ist.

5 Eine grobe Endotoxin-Abreicherung von Proteinen auf einen Wert bis zu 10 EU/ml ist mit den bestehenden Verfahren in vielen Fällen möglich. Die verbleibende Konzentration an Endotoxin wirkt jedoch immer noch toxisch. Eine weitere Abreicherung (=Feinreinigung) ist daher geboten bzw. abhängig von der Dosis des Proteins in der medizinischen Anwendung, von der 10 Europäischen Pharmacopeia (z.B. 5 EU/kg Körpergewicht und Stunde in intravenösen Anwendungen) und der FDA verbindlich vorgeschrieben. Allerdings ist diese Feinreinigung mit vorhandenen Methoden oft nicht zufriedenstellend gewährleistet. Die marktgängigen Verfahren weisen hier erhebliche Nachteile auf und sind bei bestimmten Proteinen oft nicht, oder nur unter 15 erheblichen Verlusten des Zielproteins, anwendbar.

Daher liegt der Erfindung die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, das Endotoxine in Proben nachweisen kann. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zu Grunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Endotoxine aus wässrigen Lösungen entfernt werden können.

20 Die Aufgaben werden durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die nachfolgenden Figuren erläutern die Erfindung.

25 Fig. 1 zeigt eine schematische Übersicht der chemischen Struktur von Endotoxin aus *E. coli* O111:B4. Hep = L-Glycero-D-manno-heptose; Gal = Galactose; Glc = Glucose; KDO = 2-Keto-3-désoxyoctonsäure; NGa = N-Acetyl-galactosamin; NGc = N-Acetylglucosamin.

30 Figur 2 zeigt die Ergebnisse von Versuchen mit Chromatographiesäulen, die über Sulfhydrylreste immobilisiertes NStrepS3Cp12 tragen. (A) Endotoxinentfernung aus Proteinlösungen: Rinderserumalbumin (BSA), Carbonanhydrase (CA) und Lysozym (Lys). wurden 1 h auf der Säule inkubiert und anschließend mit Puffer eluiert. Die Endotoxinkonzentration vor und nach der Säule wurden mit dem LAL-Test gemessen und daraus die prozentuale Abnahme berechnet. (B) Proteinwiederfindung: Die Proteinkonzentrationen der

Ausgangslösungen und der Fraktionen nach der Säule wurden durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt und daraus die prozentuale Proteinwiederfindung ermittelt.

Figur 3 zeigt die Endotoxinentfernung aus einer Lysozymlösung über Chromatographiesäulen mit „ungerichtet“ (1) und „gerichtet“ (2) immobilisiertem p12. In beiden Fällen wurde an NHS-aktivierter Säulen p12 S3C gebunden. Die „ungerichtete“ Immobilisierung erfolgte über primäre Aminreste von p12S3C, die durch Reaktion mit den NHS-Gruppen kovalente Verbindungen mit der Trägersubstanz eingehen. Eine „gerichtete“ Verknüpfung von p12S3C über ein N-terminales Cystein wird durch Diaminoethan und SIA (N-succinimidyl-iodoacetat) erreicht. (A) prozentuale Endotoxinentfernung. (B) Proteinwiederfindung.

Figur 4 zeigt die Ergebnisse von Versuchen mit biotinyliertem p12, das über Streptavidin an magnetische Beads gebunden wurde. (A) Die Endotoxinabreicherung aus Puffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) und Proteinlösungen wurde mittels LAL-Test bestimmt. (B) Für die Proteinlösungen wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen ermittelt. Die Abtrennung der Beads von der Lösung erfolgte mit Hilfe eines Magnetseparators. BSA: Rinder-Serumalbumin. CA: Carbonanhydrase. Lys: Lysozym.

Figur 5 zeigt die Ergebnisse der Endotoxinentfernung mit p12, das über Biotin-Streptavidin Wechselwirkungen auf Agarose-Beads immobilisiert wurde. Die Abtrennung des immobilisierten p12 erfolgte durch Zentrifugation. Die Endotoxinentfernung aus Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) und BSA-Lösungen wurde anhand der Endotoinkonzentrationen von Ausgangslösung und Überstand bestimmt.

Figur 6 zeigt Ergebnisse von Oberflächen-Plasmon-Resonanz Messungen. (A) Resonanzkurven, die als Antwort auf Injektion von verschiedenen (je in μ g/ml: 100; 25; 6,25; 4; 1,56; 0,4) p12-Konzentrationen (—) gemessen wurden. Die Bindung erfolgt an Endotoxin von *E. coli* D21f1, das auf einem hydrophoben HPA-Chip immobilisiert wurde. Die Injektion von p12 und EDTA (5 mM) wird durch Balken über den Kurven markiert. Puffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0. (B) Gleichgewichtsresonanzwerte für die Bindung von p12 an immobilisiertes Endotoxin wurden etwa 600 s nach Beginn der p12 Injektion gemessen und gegen die dazugehörigen p12-Konzentration aufgetragen. Die durchgezogene Linie zeigt einen Fit der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ($RU = RU_{max} * [p12] / ([p12] + K_d)$) an die Daten. (C) Bindung von *E. coli* an biotinyliertes p12, das auf Streptavidin-Chips immobilisiert wurde. *E. coli* D21e8 (—), dessen

innerere Herz-Region vollständig ist, an p12. Dagegen bindet *E. coli* D21f2 (---), der eine stark verkürzte Herz-Region besitzt, bindet nicht an p12. Die Messungen wurden in PBS durchgeführt.

5 Figur 7 zeigt schematisch die Struktur der Endotoxin-Herzregion verschiedener *E.coli*-Mutanten.

Figur 8 zeigt schematisch das Ergebnis einer Endotoxin-Abreicherung mittels Chromatographiesäulen-Durchflussverfahren. E bedeutet Äquilibrierungspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5), A bedeutet Waschpuffer A (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5), B bedeutet Elutionspuffer B (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.5), C bedeutet Regenerationspuffer C (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.005 % NaDOC, pH 7.5), S bedeutet Konzentration von Protein und Endotoxin in der Ausgangslösung. BSA bedeutet Rinderserumalbumin. EU bedeutet Endotoxin Units (Endotoxin Einheiten). Nach Injektion (I) von 4 ml der Ausgangslösung (S) wurde mit 15 ml Waschpuffer nachgespült und der Durchlauf fraktioniert (je 2.5 ml während des Auftrags, je 2 ml während des Waschens). Anschliessend wurde die Säule mit den Puffern B und C regeneriert und der Auslauf ebenfalls in Fraktionen (je 2 ml) gesammelt. Wie in der Figur ersichtlich, war das BSA in den ersten 3-5 Fraktionen nach der Injektion zu finden. Der Gehalt an Endotoxin in diesen Fraktionen war um den Faktor 100 niedriger als in der Ausgangslösung. Das an die Säule gebundene Endotoxin wurde dann mit den Puffern B und C von der Säule gewaschen.

Figur 9 zeigt schematisch die Ergebnisse der Endotoxin Entfernung aus gering verunreinigter Pufferlösung (5 EU/ml) im Durchflussverfahren. p12 wurde ungerichtet auf NHS-aktivierter Sepharose 4 FastFlow (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) immobilisiert (8 mg p12/ 1 ml Sepharose) und 3 Säulen mit je 2 ml Säulenvolumen gegossen. Das Experiment wurde parallel auf 3 Säulen durchgeführt. Vor dem Auftrag der Probe wurde jeweils 1 ml Äquilibrierungspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5) gesammelt, danach die Probe (S: Endotoxin aus *E. coli* O55:B5 in Äquilibrierungspuffer, 4.6 EU/ml) injiziert (I) und Fraktionen von 5 ml und 2 ml gesammelt. Die Regeneration der Säule erfolgte durch Zugabe von 4 ml Regenerationspuffer (B: 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.005 % NaDOC, pH 7.5). Die Endotoxin Konzentration wurde mittels LAL-Test bestimmt (kinetisch chromogener LAL-Test, Charles River Inc.). Die Endotoxin Verunreinigungen konnten in allen drei Experimenten vollständig entfernt werden, d.h. die Endotoxin Konzentration im Durchlauf lag unter der Nachweisgrenze (<0.005 EU/ml).

Der Begriff "Endotoxinabreicherung" wie hier verwendet bedeutet vollständige oder teilweise Entfernung von Endotoxin aus Probenmaterial.

5 Der Begriff "Endotoxin" wie hier verwendet bezeichnet bakterielles Lipopolysaccharid, das Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien ist.

Der Begriff "Bakteriophagenschwanzprotein" wie hier verwendet bezeichnet solche Proteine, die in Bakteriophagen vorkommen und Bestandteile von Zellmembranen binden können. 10 Üblicherweise sind diese Proteine im Bakteriophagenschwanz lokalisiert, können jedoch auch auf dem Bakteriophagenkopf oder bei Bakteriophagen ohne Schwanz auf der normalen Bakterienhülle lokalisiert sein. Die von dem Bakteriophagenschwanzprotein gebundenen Zellbestandteile erkennen insbesondere Endotoxine.

15 Der Begriff "unspezifische Immobilisierung" oder "ungerichtete Immobilisierung" wie hier verwendet bedeutet, dass die Kopplung eines Proteins an eine Matrix über Proteinreste (z.B. primäre Amine) erfolgt, die über die gesamte Proteinoberfläche verteilt sind. Die Auswahl der für die Kopplung des einzelnen Proteinmoleküls verwendeten Gruppe ist zufällig.

20 Der Begriff "gerichtete Immobilisierung" wie hier verwendet bedeutet, dass die Kopplung über Aminosäurereste oder andere Reste (z.B. Glykosylierungen des Proteins) erfolgt, deren Position im Protein (z. B. N- oder C-terminal) bekannt ist. Die Auswahl dieser Gruppen für die Kopplung erfolgt durch die Auswahl geeigneter Reaktionspartner/Linker, die bevorzugt mit diesen Resten reagieren (z.B. Kopplung von Sulfhydrylresten an Iodoacetatreste; Iodoacetat reagiert tausendmal schneller mit Sulfhydrylresten als mit Aminoresten).

25 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Endotoxin, umfassend die Schritte:

30 a) Inkubieren einer Probe mit einem Bakteriophagenschwanzprotein,
b) Nachweis von an Bakteriophagenschwanzprotein gebundenes Endotoxin.

Vorzugsweise betrifft die Erfindung ein Verfahren, bei dem der Nachweis mittels spektroskopischer Verfahren, z.B. Fluoreszenzemission, Fluoreszenzpolarisation, Absorption

oder Circulardichroismus, oder mittels Kapazitätsmessung, z.B. elektrische Signale, oder indirekt mittels Kompetitionsnachweis durchgeführt wird.

Gegebenenfalls wird nach Schritt a) und vor Schritt b) ein zusätzlicher Schritt a') Abtrennung
5 von Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplex von der Probe eingeführt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Entfernung von Endotoxin aus einer Probe, umfassend die Schritte:

10 a) Inkubation oder in Kontakt bringen einer Probe mit Bakteriophagenschwanzproteinen, die unspezifisch oder gerichtet, an einem festen Träger immobilisiert sind,
b) Trennen des Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexes von der Probe.

Vorzugsweise wird vor der Inkubation die Ionenzusammensetzung der zweiwertigen Ionen z.B.
15 Ca^{2+} , Mg^{2+} und/oder der pH-Wert eingestellt, um eine optimale Endotoxin-Bakteriophagenschwanzprotein-Bindung zu erhalten. Ferner bevorzugt wird bei oder nach der Inkubation eine „Demaskierung“ des gebundenen Endotoxins durch Zugabe von Detergentien und/oder Salzen, z.B. Tween, Triton, NaCl oder Ammoniumsulfat, oder anderer Substanzen, z.B. Chitosan, Zucker oder Lipide, die ein Ablösen der Endotoxine von z.B. Proteinen oder
20 Nukleinsäuren beschleunigen.

Das Bakteriophagenschwanzprotein kann ein natürlicherweise vorkommendes oder ein molekularbiologisch oder biochemisch modifiziertes sein. Das Bakteriophagenschwanzprotein kann aus verschiedenen Gründen gentechnisch und/oder biochemisch modifiziert sein. Für die erfindungsgemäßen Verfahren können jedoch nicht nur die natürlicherweise vorkommenden Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, sondern auch deren Varianten. Varianten bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, dass die Bakteriophagenschwanzproteine eine veränderte Aminosäuresequenz aufweisen. Diese können durch Screening der natürlich auftretenden Varianten, oder durch Zufalls-Mutagenese oder gezielte Mutagenese, aber auch durch chemische Modifikation erhalten werden. Die für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Bakteriophagenschwanzproteine können durch eine gezielte oder zufällige Mutagenese in ihrer Spezifität bzw. ihren Bindungseigenschaften an Trägerstrukturen angepasst werden. Diese Bindung an die Träger kann fest, z.B. kovalent oder über eine spezifische oder unspezifische Biotinylierung erfolgen, aber auch reversibel z.B. über eine reduzierbare

Disulfidbrücke erfolgen. Ferner kann durch eine Modifikation die Stabilität erhöht werden. Durch die molekularbiologische oder chemische Mutagenese werden Mutationen eingeführt, die Aminosäureadditionen, -deletionen, -substitutionen oder chemische Modifikationen sein können. Diese Mutationen können eine Veränderung der Aminosäuresequenz in der Bindungsregion der Bakteriophagenschwanzproteine bewirken, mit dem Ziel, Spezifität und Bindungsaffinität an Testbedürfnisse anzupassen, z.B. die Bindung der Endotoxine an die Bakteriophagenschwanzproteine zu erhöhen oder irreversibel zu machen, um den Nachweis oder die Abreicherung zu verbessern. Darüber hinaus kann eine gentechnische oder biochemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, mit dem Ziel, die gegebenenfalls vorhandene enzymatische Aktivität auszuschalten, um dadurch die Bindung zu verbessern oder irreversibel zu machen. Weiterhin kann eine gentechnische oder chemische Modifikation der Phagenproteine durchgeführt werden, um die vorhandenen physikalischen Eigenschaften des Proteins wie Löslichkeit Thennostabilität usw. im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens anzupassen.

Arbeiten zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von T4 p12 hatten gezeigt, dass bei erhöhter Temperatur proteolytische Fragmente von 33 kDa und 45 kDa erzeugt werden können, die N- und C-terminal (33 kDa) bzw. nur N-terminal (45 kDa) verkürzt sind. Im Gegensatz zu dem 33kDa Fragment ist das 45kDa Fragment noch in der Lage an Bakterien zu binden. Demzufolge ist der C-Terminus an der Zellbindung beteiligt.

Die Modifikation kann ferner insbesondere den Zweck haben, einen direkten Nachweis z.B. mittels Messung der Tryptophanfluoreszenz zu ermöglichen. Beispielsweise besitzt P12 fünf Tryptophan-Reste. Das Fluoreszenzspektrum des nativen Proteins deutet darauf hin, dass diese Reste weitestgehend lösungsmittel-unzugänglich sind. Aus einer Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten ist bekannt, dass fast immer aromatische Aminosäuren an der Bindung von Zuckerresten, wie sie auch in Endotoxin vorkommen, beteiligt sind. Die Bindung der Zuckerreste an Proteine kann durch einen Quench der Tryptophanfluoreszenz, bzw. gegebenenfalls auch zusätzlich durch eine Veränderung des Fluoreszenzmaximums verfolgt werden. Eigene Arbeiten lassen vermuten, dass die ungünstige Verteilung der Fluorophore des natürlichen p12 eine Ausnutzung der Fluoreszenz-Eigenschaften von p12 zur Bindungsmessung verhindert. Die Fluoreszeineigenschaften von p12 werden durch die fünf Tryptophanreste dominiert, deren Fluoreszenz durch die Zugabe von Endotoxin nicht messbar verändert wird. Diese Daten lassen erwarten, dass eher Tyrosinreste als Tryptophanreste an der Bindung beteiligt

sind, deren Signaländerung vor dem hohen Tryptophan-Hintergrund nicht sichtbar gemacht werden kann. Auf der Basis der Proteolyseergebnisse kommen sechs Tyrosine am C-Terminus von p12 für den Endotoxin-Nachweiskit in Frage, die entsprechend „sichtbar“ gemacht werden können. Durch einen selektiven molekularbiologischen Austausch der fünf Tryptophan-Reste gegen Tyrosine werden in einem ersten Schritt die spektroskopischen Eigenschaften so gezielt verändert, dass die Endotoxin-Bindung per Fluoreszenzsignaländerung eines einzelnen Tryptophanrestes messbar ist. Anschließend wird durch einen gezielten Austausch von jeweils einem der sechs Tyrosine im C-terminalen Bereich gegen einen Tryptophanrest die Intensität des messbaren Signals signifikant erhöht, um für die Entwicklung eines Endotoxin-Nachweiskits attraktive Signalunterschiede zu erhalten.

Welche Bakteriophagenschwanzproteine verwendet werden, hängt davon ab, welche Endotoxine nachgewiesen oder abgereinigt werden sollen. Bereits jetzt steht eine große Zahl bekannter Bakteriophagen für einen Großteil der bisher beschriebenen Bakterien zur Verfügung und kann für die erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Die Phagen und die entsprechenden Wirtsbakterien sind u.a. bei folgenden Stammsammlungen erhältlich: ATCC (USA), DSMZ (Deutschland), UKNCC (Großbritannien), NCCB (Niederlande) und MAFF (Japan).

Vorzugsweise stammen die Bakteriophagenschwanzproteine für die erfindungsgemäßen Verfahren von Bakteriophagen, deren Wirtsbakterien medizinisch oder biotechnologisch relevante Bedeutung haben, wie z.B. E. coli, das bei der Produktion rekombinanter Proteine oder von Nukleinsäuren für die Gentherapie verwendet wird. Besonders bevorzugt sind Bakteriophagenschwanzproteine, die stark konservierte Bereiche von Endotoxin binden, wie z.B. die Herzregion oder Lipid A. Insbesondere bevorzugt sind p12 und p12-ähnliche Bakteriophagenschwanzproteine. Bei einer Kombination von Endotoxin-Verunreinigungen aus verschiedenen Wirtsbakterien kann eine Kombination der entsprechenden Endotoxin-erkennenden Bakteriophagenschwanzproteine eingesetzt werden.

Der Nachweis oder die Abreicherung von Endotoxin in oder aus einer Probe erfolgt über die Bindung von Endotoxin an die Bakteriophagenschwanzproteine. Diese Bindung kann z.B. durch direkte Messung mittels spektroskopischer Verfahren, z.B. über Fluoreszenzemission, Fluoreszenzpolarisation, Absorption oder Circulardichroismus nachgewiesen werden. Darüber hinaus kann die Bindung durch elektrische Signale, z.B. eine Kapazitätsmessung sichtbar gemacht werden. Weiterhin kann die Bindung von Endotoxin an die

Bakteriophagenschwanzproteine auch indirekt über Verdrängungsexperimente nachgewiesen werden.

Für den erfindungsgemäßen Nachweis können die Bakteriophagenschwanzproteine bei Bedarf einer Abtrennung der Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexe von der Probe auf geeigneten Trägerstrukturen, z.B. Magnetpartikeln, Agarosepartikeln, Mikrotiterplatten, Filtermaterialien oder Durchflußzellkammern, gekoppelt werden (indirekter Nachweis). Die Trägerstrukturen können z.B. aus Polystyrol, Polypropylen, Polycarbonat, PMMA, Celluloseacetat, Nitrozellulose, Glas, Silizium oder Agarose bestehen. Die Kopplung kann z.B. durch Adsorption oder kovalente Bindung erreicht werden.

Für das erfindungsgemäße Abreicherungsverfahren sind die Bakteriophagenschwanzproteine an feste Träger gekoppelt. Die festen Träger können Materialien für Chromatographiesäulen (z.B. Sepharosematerialien), Filtrationsmedien, Glaspartikel, Magnetpartikel, Zentrifugations- oder 15 Sedimentationsmaterialien (z.B. Agarosepartikel) sein.

Wichtig hierbei ist eine funktionelle Kopplung, d.h. Bakteriophagenschwanzproteine verfügen trotz Bindung an das Trägermaterial über für Endotoxin zugängliche Strukturen. Die Kopplung der Bakteriophagenschwanzproteine kann unspezifisch, oder aber bevorzugt gerichtet, über z.B. 20 eine selektive Biotinylierung, oder gekoppelt über einen Spacer oder Linker erfolgen.

Dazu können die Bakteriophagenschwanzproteine mit niedermolekularen Substanzen z.B. Biotin verknüpft sein, um über diese niedermolekularen Substanzen an Polypeptide z. B. Streptavidin zu binden, die ihrerseits auf dem Träger immobilisiert wurden. Statt Biotin kann ferner der sogenannte Strep-Tag (Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. Biomolecular Engineering 16 (1999), 79-25 86) verwendet werden, der eine kurze Aminosäuresequenz ist und an Streptavidin bindet. Ferner kann der His-Tag verwendet werden, der über zweiwertige Ionen (Zink oder Nickel) oder einen für ihn spezifischen Antikörper (Qiagen GmbH, Hilden) an ein Trägermaterial binden kann. Der Strep-Tag sowie der His-Tag wird vorzugsweise über DNA-Rekombinationstechnologie an die 30 rekombinant hergestellten Bakteriophagenproteine gebunden. Diese Kopplung kann gerichtet, z.B. am N- oder C-Terminus oder ungerichtet erfolgen. Die gerichtete Kopplung erfolgt über eine geeignete, reaktive, natürlicherweise bei Phagenproteinen nicht häufig oberflächenexponierte Aminosäure wie Cystein, das an geeigneter Stelle gezielt eingeführt wurde. Da Phagenschwanzproteine im Cytoplasma synthetisiert werden, ist nicht mit

Disulfidbrücken zu rechnen. Vorzugsweise kann auch über andere Aminosäuren direkt, oder wie auch bei Cystein über einen „Spacer“ oder „CrossLinker“ (Monofunktionell oder bifunktionell) indirekt gekoppelt werden.

5 Bei der Cysteinkopplung sind alle bifunktionellen Crosslinker mit NH- und SH-reaktiven Gruppen, mit und ohne Zwischenspacer, z.B. 11-Maleimidoundecanoic acid sulfo-NHS oder Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxy-[6-amido]caproate möglich. Söfern keine Spacer vorhanden sind, können 8-12 C-Atom-Spacer mit endständiger NH-Gruppe eingefügt werden. Vorzugsweise erfolgt die Cysteinkopplung über eine spezifische 10 Biotinylierung des Cysteins durch z.B. EZ-Link-PEO-Maleimide activated Biotin (Pierce).

Zweiwertige Ionen, wie z.B. Ca^{2+} oder Mg^{2+} sind für eine Bindung von Endotoxinen an Phagenproteine wie p12 wichtig. Durch Zugabe von geeigneten Chelatoren, wie z.B. EDTA oder EGTA, kann diese Bindung jedoch gelöst werden. Bevorzugt für die Bindung sind Ca^{2+} - 15 Konzentrationen im Bereich von etwa $0,1 \mu\text{M}$ bis etwa 100 mM , besonders bevorzugt im Bereich von etwa $0,1 \mu\text{M}$ bis etwa 10 mM , insbesondere bevorzugt im Bereich von etwa $0,1 \mu\text{M}$ bis etwa 1 mM und ferner insbesondere bevorzugt im Bereich von etwa $10 \mu\text{M}$ bis 1 mM . Erniedrigt man die Konzentration zweiwertiger Ionen durch Zugabe von 1 mM EDTA unter 100 nM , so wird die Bindung von Endotoxin an p12 gelöst. Mg^{2+} -Konzentrationen über 10 mM verschlechtern die Bindung von Endotoxin an p12, was sich in einer Erhöhung der Dissoziationskonstante bemerkbar macht. Ohne Zugabe von Mg^{2+} ergibt sich ein K_d -Wert von 50 nM und in einem Puffer mit 10 mM Mg^{2+} wurde ein K_d -Wert von $1 \mu\text{M}$ gemessen. Zink zeigte eine noch stärker hemmende Wirkung. 1 mM Zn erhöht den K_d -Wert auf $10 \mu\text{M}$. Eine 20 Einstellung der Konzentration zweiwertiger oder anderer Ionen (z.B.: Cu^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+}) auf einen für die Bindung optimalen Bereich kann durch Substanzen, wie HEDTA, NTA bzw. allgemein Chelatoren/Puffer (ADA: N-[2-Acetamido]-2-iminodiacetic acid; 5-AMP: Adenosin-5'-Monophosphat; ADP: Adenosin-5'-Diphosphat; ATP: Adenosin-5'-Triphosphat; Bapta: 1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid; Citrat: Zitronensäure; EDTA: Ethylenediamintetraacetic acid; EGTA: Ethleneglycol-bis(β-aminoethyl Ether); N,N,N',N'-Tetraacetic acid; HEDTA: N-hydroxyethylethylenediaminetriacetic acid; NTA: Nitrilotriacetic acid; SO_4 . Sulfat) erfolgen, die als Puffer für zweiwertige Ionen benutzt 25 werden können.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können daher ferner Waschschrifte umfassen. Je nachdem, ob

ein direkter oder indirekter Nachweis oder die Abreicherung eine Abtrennung von Probe und Bakteriophagenschwanzprotein nötig macht, können Waschschritte eingebaut werden. Da Ca^{2+} oder andere Metallionen (z.B. Mg^{2+}) essentiell für die Bindung sind, kann die Bindung von Endotoxin an z.B. p12 durch geeignete Waschschritte gelöst werden. Je nach Ziel, ob Endotoxin auf dem Bakteriophagenschwanzprotein, z.B. p12 gebunden bleiben soll, wird mit EDTA-freiem Puffer gewaschen, wenn die Bindung gelöst werden soll mit EDTA-haltigem Puffer, wobei die EDTA-Konzentrationen im Bereich von mindestens 0,05 mM bis mehr als 10 mM, vorzugsweise im Bereich von 2 mM bis 5 mM liegt.

10 Die Abtrennung erfolgt nach Inkubation der Probe mit dem entsprechenden mit Bakteriophagenschwanzproteinen gekoppelten Trägermaterial für etwa 5-60 min oder etwa 30-180 min oder bei Bedarf auch über Nacht. Dazu wird die Probe z.B. aus der Chromatographiesäule eluiert, oder filtriert, oder die entsprechenden Partikel abzentrifugiert oder absedimentiert; bzw. durch Anlegen eines Magnetfeldes magnetisch separiert. Die Abtrennung in dem hier beschriebenen Batch-Verfahren, d.h. mit Vorinkubation von Probe und mit den entsprechenden Bakteriophagenschwanzproteinen gekoppelten Trägermaterialen, kann insbesondere bei sehr niedrigen Endotoxinkonzentrationen sinnvoll sein.

20 Die Abreicherung von Endotoxinen über Chromatographiesäulen kann aber auch im reinen Durchflussverfahren erfolgen. Die Probe kann dazu auf die Säule aufgetragen werden, die ein Trägermaterial mit daran gekoppelten Bakteriophagenschwanzproteinen enthält. Die Flussrate ist abhängig von Volumen und Geometrie der Säule. Die Flussrate ist ferner abhängig von Volumen und Endotoxingehalt der Probe, um durch eine möglichst lange Kontaktzeit zwischen Säule und Endotoxin auch bei niedrigen Endotoxinkonzentrationen eine effiziente Abreicherung zu erzielen. Die Kontaktzeit ist dabei die Zeit, die die Probe vom Auftragen auf die Säule bis zum Herausfließen benötigt.

25 Der Abtrennschritt kann z.B. im Abreicherungsverfahren zur Regenerierung der Bakteriophagenschwanzproteine benutzt werden, die an den festen Träger gekoppelt sind. Dadurch kann der feste Träger, z.B. eine Matrix in einer Chromatographiesäule wiederverwendet werden. Die Regenerierung erfolgt durch Entfernen des gebundenen Endotoxins durch einen geeigneten Regenerierungspuffer enthaltend EDTA oder einen entsprechenden Chelator. Bei EDTA wird eine Konzentration von größer 2 mM EDTA bevorzugt, insbesondere größer 10 mM EDTA.

Da ionische Wechselwirkungen grundsätzlich immer durch Veränderungen der Ionenstärke beeinflussbar sind, können auch Erhöhungen oder Erniedrigungen anderer Salze in Lösung, wie z.B. NaCl oder KCl, die Bindung von Endotoxin an die Bakteriophagenschwanzproteine 5 beeinflussen.

Um die Bindung im Nachweisverfahren direkt oder indirekt sichtbar zu machen, kann auch das Protein molekularbiologisch oder biochemisch verändert werden, um die Messung zu ermöglichen, bzw. zu verbessern. Um eine Bindung von Endotoxin z.B. an p12 direkt sichtbar zu 10 machen, kann ein molekularbiologischer Austausch von Tyrosinresten gegen Tryptophan durchgeführt werden. Für eine Reduktion des Signalhintergrundes kann es dabei nötig sein, die ursprünglich enthaltenen Tryptophane gegen Tyrosine auszutauschen. Um auch in proteinhaltigen 15 Lösungen messen zu können, kann p12 nach Tryptophan-Einführung zusätzlich chemisch modifiziert werden. Dabei werden Tryptophanreste durch Koshland-Reagenz (2-Hydroxy-5-nitrobenzylbromid) hinsichtlich ihrer spektrokopischen Eigenschaften verändert. Bei Verdrängungsexperimenten kann markiertes, z.B. fluoreszenzmarkiertes Endotoxin (z.B. Sigma) durch in der Probe befindliches Endotoxin z.B. von p12 verdrängt und die Konzentration von 20 freiem fluoreszierendem Endotoxin bestimmt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann Endotoxin aus und in allen wässrigen Lösungen 25 nachgewiesen und entfernt werden. Diese Lösungen können: Proteine, Plasmid-DNA, genetische DNA, RNA, Protein-Nukleinsäurekomplexe wie z.B. Phagen oder Viren, Saccharide, Impfstoffe, Arzneimittel, Dialysepuffer (Medizin), Salze oder andere durch Endotoxin-Bindung verunreinigte Substanzen enthalten.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, an die sogenannte Tags, z.B. der Strep- oder der His-Tag, vorzugsweise an den N- oder C-Terminus des Proteins, besonders bevorzugt an den C-Terminus, gekoppelt sind. Bevorzugt ist die Kopplung oder Verknüpfung der Tags mit den Bakteriophagenproteinen über DNA-Rekombinationstechnologie. Herstellung 30 der Nukleinsäure, umfassend die Sequenz des Bakteriophagenproteins und des Tags und die Herstellung des Expressionsprodukts sind Stand der Technik und brauchen hier nicht gesondert erläutert zu werden. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die ein Bakteriophagenprotein zusammen mit dem Strep- oder His-Tag codiert. Ein besonders bevorzugtes mit dem Strep- oder His-Tag modifiziertes Bakteriophagenprotein ist das p12-

Protein vom Phagen T4, jedoch sind alle anderen Bakteriophagenproteine die an der Erkennung und Bindung von Bakterien beteiligt oder dafür verantwortlich sind ebenfalls bevorzugt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Bakteriophagenproteine, mit einem Tag, der ein 5 oberflächenexponiertes Cystein zur spezifischen, gerichteten Biotinylierung aufweist, z.B. die Tags gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7. Ein Beispiel für ein p12 mit Tag ist die in SEQ ID NO:8 aufgeführte Aminosäuresequenz. Bevorzugt ist ein p12 mit einem Tag, insbesondere mit einem 10 Tag mit einem oberflächenexponierten Cystein, insbesondere ein p12 mit dem Tag gemäß SEQ ID NO: 6 und 7. Diese gerichtete Biotinylierung kann zusätzlich durch einen geeigneten Spacer oder Linker vermittelt werden. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Aminosäuren mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die 15 Nukleinsäuren, codierend die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO:5, 6 und 7.

Die erfindungsgemäßen Verfahren bieten gegenüber den Nachweis- und Reinigungsverfahren 20 für und von Endotoxin Vorteile in der Performance entsprechender Anwendungen. Ferner ist die Herstellung von Antikörper gegen LPS-Herzoligosaccharide sehr schwierig, was entsprechende 15 Verfahren auf Antikörper-Basis sehr teuer werden lässt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen. 25 Sofern nicht anders angegeben, wurden molekularbiologische Standardmethoden verwendet, wie z.B. von Sambrook et al., 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben.

1. Glasgefäß, Plastikgefäß und Puffer

25 Für die Endotoxinentfernung wurden alle Glasgefäß durch Ausbacken bei 200°C (4h) entpyrogenisiert und ausschließlich pyrogenfreie Plastikmaterialen (z.B. Pipettenspitzen, Microtiterplatten) verwendet. Andere, nicht hitzebeständige Geräte oder Gefäße, wurden entweder mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt oder mit 1% Natriumdeoxocholat gewaschen. 30 Anschließend wurde sie mit endotoxinfreiem Wasser gespült. Die Puffer wurden aus weitgehend endotoxinfreien Puffersubstanzen (Sigma) hergestellt und mit endotoxinfreiem Wasser angesetzt. Salze, wie z.B. NaCl, die auf 200°C erhitzt werden können, wurden ausgebacken (200°C, 4h). 35 Für chromatographische Reinigungen verwendete Puffer wurden entgast und filtriert.

2. Endotoxinnachweis mittels LAL-Test

21

Endotoxin-Kontrollnachweise wurden mit einem chromogenen LAL-Test (Limulus-Amebocyte-Lysate Test, Charles-River Endosafe, Charleston, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Endotoxin-Standards (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) im Bereich von 0.005-50, bzw. 0.02-50 EU/ml eingesetzt. Die Absorptionsmessung bei 405 nm erfolgte in einem temperierbaren Mikrotiterplatten-Reader (Genios, Tecan GmbH).

3. Western-Blot zum p12-Nachweis

Der Nachweis von p12 im Überstand von mit Beads behandelten Proben bzw. in den Fraktionen der Affinitätschromatographie erfolgte durch Western Blots. Zum Teil wurden die Proteine vorher durch NaDOC/TCA-Fällung (Natriumdeoxycholat/Tetrachloracetat) aufkonzentriert. Die Proben wurden dazu auf 12%-igen SDS Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF Membranen (Immobilon, Millipore) übertragen. Die Membranen wurden mit PBS 30 min gewaschen, mit 5% Milchpulver blockiert (1 h) und anschließend mit polyklonalem anti-p12 Antikörper inkubiert (1h, Verdünnung: 1: 1000). Nach Inkubation mit einem, mit alkalischer Phosphatase konjugierter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG) erfolgte die Entwicklung der Proben mit BCIP/NBT (5-Brom-4-chloroindolylphosphat/Nitroblau-Tetrazoliumsalz).

4. Endotoxin-Reinigung

Die Reinigung von Endotoxin wurde nach der Vorschrift von Galanos, C., Lüderitz, O. & Westphal, O. 1969, Europ. J. Biochem. 9, 245-249 durchgeführt.

Beispiel 5: Spezifische Kopplung von p12 an immobilisierte Jodoacetylreste:

Um eine gerichtete Bindung von p12 an die Oberfläche zu erreichen wurde die Aminosäure Serin an Position 3 des Strep-Tags gemäß SEQ ID NO:5 durch Cystein wie in Beispiel 12 ersetzt und das Protein über Jodoacetylreste, die bevorzugt freie Sulfhydrylreste binden, immobilisiert. Das resultierende p12 wurde p12S3C genannt.

Es wurde ein 1 ml Sulfolink Coupling Gel (Pierce) gegossen, mit 6 ml 1% Natriumdeoxycholat gewaschen und mit 6 ml Kopplungspuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) equilibriert. Anschließend wurden 1 ml p12S3C (=N-StrepS3Cp12) (1-1.5 mg/ml in

Kopplungspuffer) injiziert, die Säule 15 min leicht geschüttelt, weitere 30 min ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, und nochmals 1 ml p12S3C injiziert und die Inkubationsschritte wiederholt. Diese Kopplung von p12S3C wurde insgesamt 4 mal wiederholt, und anschließend die Säule mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Die Durchläufe wurden gesammelt und die jeweilige p12S3C Konzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Es wurden 2.2-2.8 mg p12S3C pro ml Gel gebunden. Anschließend wurden überzählige Jödoacetylreste durch Inkubation (45 min) mit 1 ml Cystein (50 mM in 50 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8.5) blockiert. Nach Waschen der Säule mit 16 ml 1M NaCl und 16 ml 20 mM Hepes, 150 mM NaCl pH 7.5 war die Säule fertig zum Gebrauch.

Die Fähigkeit dieses Gels Endotoxin aus Proteinlösungen zu entfernen, wurde mit BSA (2-4 mg/ml), Carbon Anhydrase (1-2 mg/ml) und Lysozym (3-4 mg/ml) getestet. BSA und Lysozym Lösungen wurden mit Endotoxin von *E. coli* O55:B5 (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) oder *E. coli* HMS 174 gespickt (100-1000 EU/ml), während die Carbon Anhydrase nicht mit zusätzlichem Endotoxin versetzt wurde. Es wurden jeweils 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Die Proteine wurden fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine konnten aus allen 3 Proteinlösungen fast vollständig (93-99%) entfernt werden, wie in Fig. 2A gezeigt. Außerdem konnten die Proteine weitgehend von der Säule eluiert werden (80-99%, Fig. 2B). Die Säule wurde abschließend mit 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 regeneriert. Um Verunreinigungen der Proteinfraktionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Beispiel 6: Unspezifische Kopplung von p12 an NHS-aktiviertes Trägermaterial:

N-hydroxysuccinimid (NHS) wird aus Verbindungen durch primäre Aminoreste verdrängt und deshalb zum Koppeln von Proteinen an Oberflächen benutzt. NHS-aktivierte Sepharose Säulen (HiTrap NHS-activated HP, 1 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) wurden zunächst mit 6 ml eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen. Anschließend wurden bei Raumtemperatur 10-15 ml p12S3C (1.0-3.5 mg/ml) in 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3 zirkulär über die Säule gepumpt (Flussrate 0.8 ml/min). Nach 60 min wurde der Durchlauf fraktionsweise gesammelt und die

Säule mit 6 ml Puffer gewaschen. Aus diesen Fraktionen wurde das NHS durch Entsalzen der Lösung über HiTrap-Desalting Säulchen (5 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) abgetrennt und anschließend die p12-Menge durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. 20-25 mg p12S3C wurden an die Säule gebunden. Die Säule wurde nach der Kopplung entsprechend den Herstellerangaben wiederholt mit jeweils 6 ml Blockierungspuffer (0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3) und Waschpuffer (0.1 M Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) gespült. Anschließend wurde die Säule mit 6 ml Gebrauchspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) equilibriert.

Die Endotoxinentfernung über diese Säule wurde mit Lysozymlösungen (3-4 mg/ml in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) getestet. Die Lysozymlösungen wurden mit Endotoxin von *E. coli* HMS 174 gespickt (~500 EU/ml). Es wurden 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Das Lysozym wurden fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine wurden zu 85-90% aus der Lösung entfernt, wie in Fig. 3A gezeigt und 85-90% des Lysozyms konnten durch Waschen mit Gebrauchspuffer wieder von der Säule eluiert werden (Fig. 3B). Die Säule wurde anschließend mit 6 ml 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 und 6 ml 1 M NaCl gewaschen. Um Verunreinigungen der Proteinfraktionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Beispiel 7: Gerichtete Kopplung von p12 an über Diaminoethan und N-Succinimidyl-iodoacetat (SIA) als Spacer an NHS-aktiviertes Trägermaterial-Säule.

Um eine gerichtete Bindung an das Chromatographie Trägermaterial zu erreichen wurde ein bifunktioneller Linker an NHS-aktivierte Oberfläche gebunden, der eine Kopplung von p12S3C über dessen freies Cystein und Jodoacetylreste des bifunktionalen Linkers ermöglicht.

NHS-aktivierte Sepharose Säulen (HiTrap NHS-activated HP, 1 ml, Amersham-Pharmacia-Biotech) wurden zunächst mit 6 ml eiskalter 1 mM Salzsäure gewaschen, danach 1 ml Etylendiamin (10 mg/ml in 0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) injiziert und die Säule 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Blockieren überzähliger NHS-Gruppen mit Ethanolamin

(0.5 M Ethanolamin, 0.5 M NaCl, pH 8.3) und Waschen (0.1 M Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) der Säule wurde die Säule mit 6 ml Boratpuffer (50 mM Natriumborat, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.3) equilibriert. Anschließend wurde 30 min lang 10 ml N-Succinimidyl-iodoacetat (SIA, Pierce, 200 µl SIA-Stammlösung in 10 ml Boratpuffer; SIA-Stammlösung: 1.4 mg SIA in 1 ml DMSO) zirkulär über die Säule gespült. Die Säule wurde danach mit 6 ml Boratpuffer gewaschen und 1 Stunde lang p12S3C (1 mg/ml, 50 ml in Boratpuffer) über die Säule gespült. Überschüssige Iodoacetylreste wurden mit 1 ml Cysteinlösung (5 mM Cystein in Boratpuffer, 15 min bei Raumtemperatur inkubieren) abgesättigt, bevor die Säule mit den Gebrauchspuffern (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) equilibriert wurden. Die Kopplungsreaktionen mit SIA wurden im Dunkeln durchgeführt.

Die Endotoxinentfernung über diese Säule wurde mit Lysozymlösungen (3-4 mg/ml in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 oder 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5) getestet. Die Lysozymlösungen wurden mit Endotoxin von *E. coli* HMS 174 gespickt (~500 EU/ml). Es wurde 0.5 ml Proteinlösung auf die Säule gegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Säule mit Puffer gewaschen. Das Lysozym wurde fraktionsweise gesammelt und der Endotoxingehalt vor und nach der Säule mittels eines chromogenen LAL-Tests (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) bestimmt. Außerdem wurde die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessungen bei 280 nm ermittelt. Die Endotoxine wurden zu 90% aus der Lösung entfernt, wie in Fig. 3A gezeigt und 75-85% des Lysozyms konnten durch Waschen mit Gebrauchspuffer wieder von der Säule eluiert werden (Fig. 3B). Die Säule wurde anschließend mit 6 ml 5 mM EDTA, 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5 und 6 ml 1 M NaCl gewaschen. Um Verunreinigungen der Proteinfractionen nach dem Lauf über die Säule durch sich ablösendes p12 auszuschließen, wurden die Fraktionen mittels der Western Blot Technik auf p12 untersucht. Es konnte kein p12 in den Fraktionen nachgewiesen werden.

Beispiel 8: Entfernung von Endotoxin aus einer BSA-Lösung im Durchflussverfahren

Hi-Trap-NHS aktivierte Sepharose (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurde nach Vorschrift des Herstellers unspezifisch über primäre Aminogruppen mit p12 gekoppelt. Dabei wurden 8 mg p12/ml Gelmaterial kovalent immobilisiert. Die so erhaltene 1 ml Chromatographiesäule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min mit 10 ml Puffer A (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂) äquilibriert. Im Anschluß wurden 4 ml einer BSA Lösung (11.5 mg BSA (Carl Roth GmbH, Deutschland) / ml Puffer A) aufgetragen

(Injektion: I) und der Durchlauf (E) in 2,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wurde anschließend mit 15 ml Puffer A gewaschen und das an die Säule gebundene Endotoxin wurde mit 7 ml Puffer B (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA) eluiert. Bei Waschen und Elution wurden jeweils 2 ml Fraktionen gesammelt. Nach jedem Experiment wurde die Säule mit 20 ml Puffer C (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1 % Natriumdesoxycholat) regeneriert. Die Endotoxin-Konzentration wurde durch einen chromogenen Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test (Charles-River Endosafe, Charleston, USA), nach Vorschrift des Herstellers bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Messung der UV-Absorption. Die Endotoxin-Entfernungseffizienz betrug zwischen 95-99% und der Proteinverlust betrug etwa 6-10 %.

Beispiel 9: Entfernung geringer Endotoxinmengen aus Puffer mittels unspezifisch gekoppeltem p12.

20 ml NHS-aktivierte Sepharose 4 FastFlow (Amersham Biosciences) wurden zunächst mit eiskalter Salzsäure gewaschen und anschließend mit 292 mg p12 (7 mg/ml in 25 mM Citrat pH 7.0) 4 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 7 x 80 ml 5 mM Citrat pH 2.0 gewaschen und jeweils 1 ml der Waschfraktionen gegen 5 mM Citrat pH 2.0 dialysiert. Diese Dialysate wurden benutzt, um das überschüssige p12 in den Waschfraktionen mittels Absorptionsmessung bei 280 nm zu quantifizieren. Es wurde eine Beladungsdichte von 8.7 mg p12 pro 1ml Sepharose bestimmt. Nicht abreagierte NHS-Reste wurden durch 12 h Inkubation der Sepharose mit 1M Tris pH 8.0 abgesättigt. Mit diesem Säulenmaterial wurden Säulen mit 2 ml Volumen gegossen und diese bei 4°C in 20% Ethanol bis zum Gebrauch gelagert.

In 3 Parallelversuchen wurde jeweils 4 ml Endotoxin Lösung (S) auf eine Säule aufgetragen (siehe Fig. 9). Die Endotoxin Lösung bestand aus Endotoxin von *E. coli* Q55:B5 (Charles-River Endosafe, Charleston, USA) in Equilibrationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, pH 7.5). Die Endotoxin Konzentration dieser Lösung lag bei 4.6 EU/ml.

Die Säulen wurde zunächst mit 12 ml Regenerationspuffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.5) und anschließend mit 12 ml Equilibrationspuffer gespült. Anschließend wurde nochmals Equilibrationspuffer auf die Säule gegeben und 1ml fraktioniert.

Die Endotoxin Lösung wurden auf die Säulen aufgetragen (I) und Fraktionen von 5 ml und 2 ml gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit 4 ml Regenerationspuffer (B) regeneriert. In den Durchlauffraktionen konnte kein Endotoxin detektiert werden, d.h. die Endotoxin Verunreinigungen konnten in allen drei Experimenten vollständig entfernt werden.

Beispiel 10: unspezifische Kopplung von biotinyliertem p12 an magnetische Streptavidin-Beads.

p12 (3 mg/ml in PBS, 0.05% Tween20) wurde mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce), im Verhältnis 1:10 bis 1:20 eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend gegen Puffer (z.B. PBS oder 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 7.5) dialysiert. NHS-aktiviertes Biotin bindet dabei an primäre Aminoreste von p12. Anschließend wurden zu 1ml Streptavidin Beads (MagPrep Streptavidin Beads, Merck) 50 µl biotinyliertes p12 (1 mg/ml) gegeben, 2h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend überschüssiges p12 durch viermaliges Waschen 10 mit 1.5 ml 20 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7.5 entfernt.

Die Endotoxinentfernung wurde mit Puffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) und Proteinlösungen (0.1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml Lysozym, 0.1 mg/ml Carbon Anhydrase in 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.5) getestet. Der Puffer sowie die BSA- und Lysozym-Lösung wurde mit 5 EU/ml (Endotoxin aus *E. coli* O55:B5, Charles-River Endosafe, Charleston, USA) gespickt. Die Carbon Anhydrase Lösung enthielt etwa 1 EU/ml. Zu 200 µl Puffer bzw. Proteinlösung wurden 25 µl magnetische Beads mit immobilisiertem p12 gegeben, durch auf- und abpipettieren vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung entfernt, der Überstand abpipettiert. Der Endotoxingehalt von unbehandelten Proben und mit Beads inkubierten Proben wurde anschließend mit dem LAL-Test bestimmt und die Proteinwiederfindung durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Aus Puffer ließ sich das Endotoxin praktisch vollständig entfernen (99.9 % Endotoxinentfernung, Fig. 4A) und auch aus den Proteinlösungen wurde das Endotoxin um 70-92% (Fig. 4B) abgereichert. Die Proteinwiederfindung lag zwischen 57% und 99% (BSA: 87 20 %, Carbon Anhydrase: 99%, Lysozym: 57 %; Fig. 4B).

Beispiel 11: unspezifische Kopplung von biotinyliertem p12 an immobilisiertes Streptavidin.

P12 (3 mg/ml in PBS, 0.05% Tween20) wurde mit Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce), im Verhältnis 1:10 bis 1:20 eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend gegen Puffer (z.B. PBS oder 20 mM Hepes, 150 mM NaCl 5 mM EDTA, pH 7.5) dialysiert. NHS-aktiviertes Biotin bindet dabei an primäre Aminoreste von p12. Das biotinylierte p12 wird anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit Streptavidin beladenen Chromatographiematerial (ImmunoPure immobilized Streptavidin: 6% quervernetzte Agarose Beads) inkubiert und überschüssiges p12 durch Waschen mit PBS entfernt.

Die Endotoxinentfernung wurde mit Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) und BSA (0.5 mg/ml in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.0) getestet. Je 1 ml Puffer bzw. BSA-Lösung wurden mit 10 EU/ml gespickt, 50 µl p12-Agarose zugegeben, 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt.

5 Die p12 Agarose wurde anschließend abzentrifugiert und die Endotoxin- und Proteinkonzentration im Überstand gemessen. Aus dem Puffer konnten 99% und aus der BSA-Lösung 86 % Endotoxin entfernt werden (Fig. 5). BSA konnte zu 90 % wiedergefunden werden.

10 Beispiel 12: Untersuchungen über die p12-Endotoxin Bindung mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messungen

15 Die Bindung von p12 an Endotoxin oder an Bakterien, über die Lipopolysaccharide in der äußeren Zellmembran, wurde mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Messungen untersucht (Biacore J). Um die Dissoziationskonstante (K_d) zu ermittelt, wurde Endotoxin von *E. coli* O55:B5 (Sigma) auf einem hydrophoben HPA-Chip entsprechend der Anleitung des Herstellers immobilisiert und p12 in verschiedenen Konzentrationen injiziert (Fig. 6A). Die Bindung wird in relativen „Response Units“ (RU) gemessen die Gleichgewichtswerte gegen die dazugehörigen p12-Konzentrationen aufgetragen (Fig. 6B). Durch anpassen der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ($RU = (RU_{max} * [p12]) / ([p12] + K_d)$) an diese Daten wurde der K_d -Wert ermittelt (Tabelle 1). Für die Messungen wurden endotoxinfreie Puffer verwendet. Für pH-Werte zwischen 6 und 10 wurden K_d -Werte im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-9} M ermittelt (Tabelle 1).

20 Die Bindung wurde durch Injektion von 1mM oder 5 mM EDTA wiederaufgehoben und der Chip regeneriert.

pH	Kd
6,00	3,09E-07
7,50	6,85E-08
8,00	5,86E-08
8,50	7,86E-08
9,00	3,29E-08
10,00	1,55E-07

25
30
35
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
90
95
100
105
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
160
165
170
175
180
185
190
195
200
205
210
215
220
225
230
235
240
245
250
255
260
265
270
275
280
285
290
295
300
305
310
315
320
325
330
335
340
345
350
355
360
365
370
375
380
385
390
395
400
405
410
415
420
425
430
435
440
445
450
455
460
465
470
475
480
485
490
495
500
505
510
515
520
525
530
535
540
545
550
555
560
565
570
575
580
585
590
595
600
605
610
615
620
625
630
635
640
645
650
655
660
665
670
675
680
685
690
695
700
705
710
715
720
725
730
735
740
745
750
755
760
765
770
775
780
785
790
795
800
805
810
815
820
825
830
835
840
845
850
855
860
865
870
875
880
885
890
895
900
905
910
915
920
925
930
935
940
945
950
955
960
965
970
975
980
985
990
995
1000
1005
1010
1015
1020
1025
1030
1035
1040
1045
1050
1055
1060
1065
1070
1075
1080
1085
1090
1095
1100
1105
1110
1115
1120
1125
1130
1135
1140
1145
1150
1155
1160
1165
1170
1175
1180
1185
1190
1195
1200
1205
1210
1215
1220
1225
1230
1235
1240
1245
1250
1255
1260
1265
1270
1275
1280
1285
1290
1295
1300
1305
1310
1315
1320
1325
1330
1335
1340
1345
1350
1355
1360
1365
1370
1375
1380
1385
1390
1395
1400
1405
1410
1415
1420
1425
1430
1435
1440
1445
1450
1455
1460
1465
1470
1475
1480
1485
1490
1495
1500
1505
1510
1515
1520
1525
1530
1535
1540
1545
1550
1555
1560
1565
1570
1575
1580
1585
1590
1595
1600
1605
1610
1615
1620
1625
1630
1635
1640
1645
1650
1655
1660
1665
1670
1675
1680
1685
1690
1695
1700
1705
1710
1715
1720
1725
1730
1735
1740
1745
1750
1755
1760
1765
1770
1775
1780
1785
1790
1795
1800
1805
1810
1815
1820
1825
1830
1835
1840
1845
1850
1855
1860
1865
1870
1875
1880
1885
1890
1895
1900
1905
1910
1915
1920
1925
1930
1935
1940
1945
1950
1955
1960
1965
1970
1975
1980
1985
1990
1995
2000
2005
2010
2015
2020
2025
2030
2035
2040
2045
2050
2055
2060
2065
2070
2075
2080
2085
2090
2095
2100
2105
2110
2115
2120
2125
2130
2135
2140
2145
2150
2155
2160
2165
2170
2175
2180
2185
2190
2195
2200
2205
2210
2215
2220
2225
2230
2235
2240
2245
2250
2255
2260
2265
2270
2275
2280
2285
2290
2295
2300
2305
2310
2315
2320
2325
2330
2335
2340
2345
2350
2355
2360
2365
2370
2375
2380
2385
2390
2395
2400
2405
2410
2415
2420
2425
2430
2435
2440
2445
2450
2455
2460
2465
2470
2475
2480
2485
2490
2495
2500
2505
2510
2515
2520
2525
2530
2535
2540
2545
2550
2555
2560
2565
2570
2575
2580
2585
2590
2595
2600
2605
2610
2615
2620
2625
2630
2635
2640
2645
2650
2655
2660
2665
2670
2675
2680
2685
2690
2695
2700
2705
2710
2715
2720
2725
2730
2735
2740
2745
2750
2755
2760
2765
2770
2775
2780
2785
2790
2795
2800
2805
2810
2815
2820
2825
2830
2835
2840
2845
2850
2855
2860
2865
2870
2875
2880
2885
2890
2895
2900
2905
2910
2915
2920
2925
2930
2935
2940
2945
2950
2955
2960
2965
2970
2975
2980
2985
2990
2995
3000
3005
3010
3015
3020
3025
3030
3035
3040
3045
3050
3055
3060
3065
3070
3075
3080
3085
3090
3095
3100
3105
3110
3115
3120
3125
3130
3135
3140
3145
3150
3155
3160
3165
3170
3175
3180
3185
3190
3195
3200
3205
3210
3215
3220
3225
3230
3235
3240
3245
3250
3255
3260
3265
3270
3275
3280
3285
3290
3295
3300
3305
3310
3315
3320
3325
3330
3335
3340
3345
3350
3355
3360
3365
3370
3375
3380
3385
3390
3395
3400
3405
3410
3415
3420
3425
3430
3435
3440
3445
3450
3455
3460
3465
3470
3475
3480
3485
3490
3495
3500
3505
3510
3515
3520
3525
3530
3535
3540
3545
3550
3555
3560
3565
3570
3575
3580
3585
3590
3595
3600
3605
3610
3615
3620
3625
3630
3635
3640
3645
3650
3655
3660
3665
3670
3675
3680
3685
3690
3695
3700
3705
3710
3715
3720
3725
3730
3735
3740
3745
3750
3755
3760
3765
3770
3775
3780
3785
3790
3795
3800
3805
3810
3815
3820
3825
3830
3835
3840
3845
3850
3855
3860
3865
3870
3875
3880
3885
3890
3895
3900
3905
3910
3915
3920
3925
3930
3935
3940
3945
3950
3955
3960
3965
3970
3975
3980
3985
3990
3995
4000
4005
4010
4015
4020
4025
4030
4035
4040
4045
4050
4055
4060
4065
4070
4075
4080
4085
4090
4095
4100
4105
4110
4115
4120
4125
4130
4135
4140
4145
4150
4155
4160
4165
4170
4175
4180
4185
4190
4195
4200
4205
4210
4215
4220
4225
4230
4235
4240
4245
4250
4255
4260
4265
4270
4275
4280
4285
4290
4295
4300
4305
4310
4315
4320
4325
4330
4335
4340
4345
4350
4355
4360
4365
4370
4375
4380
4385
4390
4395
4400
4405
4410
4415
4420
4425
4430
4435
4440
4445
4450
4455
4460
4465
4470
4475
4480
4485
4490
4495
4500
4505
4510
4515
4520
4525
4530
4535
4540
4545
4550
4555
4560
4565
4570
4575
4580
4585
4590
4595
4600
4605
4610
4615
4620
4625
4630
4635
4640
4645
4650
4655
4660
4665
4670
4675
4680
4685
4690
4695
4700
4705
4710
4715
4720
4725
4730
4735
4740
4745
4750
4755
4760
4765
4770
4775
4780
4785
4790
4795
4800
4805
4810
4815
4820
4825
4830
4835
4840
4845
4850
4855
4860
4865
4870
4875
4880
4885
4890
4895
4900
4905
4910
4915
4920
4925
4930
4935
4940
4945
4950
4955
4960
4965
4970
4975
4980
4985
4990
4995
5000
5005
5010
5015
5020
5025
5030
5035
5040
5045
5050
5055
5060
5065
5070
5075
5080
5085
5090
5095
5100
5105
5110
5115
5120
5125
5130
5135
5140
5145
5150
5155
5160
5165
5170
5175
5180
5185
5190
5195
5200
5205
5210
5215
5220
5225
5230
5235
5240
5245
5250
5255
5260
5265
5270
5275
5280
5285
5290
5295
5300
5305
5310
5315
5320
5325
5330
5335
5340
5345
5350
5355
5360
5365
5370
5375
5380
5385
5390
5395
5400
5405
5410
5415
5420
5425
5430
5435
5440
5445
5450
5455
5460
5465
5470
5475
5480
5485
5490
5495
5500
5505
5510
5515
5520
5525
5530
5535
5540
5545
5550
5555
5560
5565
5570
5575
5580
5585
5590
5595
5600
5605
5610
5615
5620
5625
5630
5635
5640
5645
5650
5655
5660
5665
5670
5675
5680
5685
5690
5695
5700
5705
5710
5715
5720
5725
5730
5735
5740
5745
5750
5755
5760
5765
5770
5775
5780
5785
5790
5795
5800
5805
5810
5815
5820
5825
5830
5835
5840
5845
5850
5855
5860
5865
5870
5875
5880
5885
5890
5895
5900
5905
5910
5915
5920
5925
5930
5935
5940
5945
5950
5955
5960
5965
5970
5975
5980
5985
5990
5995
6000
6005
6010
6015
6020
6025
6030
6035
6040
6045
6050
6055
6060
6065
6070
6075
6080
6085
6090
6095
6100
6105
6110
6115
6120
6125
6130
6135
6140
6145
6150
6155
6160
6165
6170
6175
6180
6185
6190
6195
6200
6205
6210
6215
6220
6225
6230
6235
6240
6245
6250
6255
6260
6265
6270
6275
6280
6285
6290
6295
6300
6305
6310
6315
6320
6325
6330
6335
6340
6345
6350
6355
6360
6365
6370
6375
6380
6385
6390
6395
6400
6405
6410
6415
6420
6425
6430
6435
6440
6445
6450
6455
6460
6465
6470
6475
6480
6485
6490
6495
6500
6505
6510
6515
6520
6525
6530
6535
6540
6545
6550
6555
6560
6565
6570
6575
6580
6585
6590
6595
6600
6605
6610
6615
6620
6625
6630
6635
6640
6645
6650
6655
6660
6665
6670
6675
6680
6685
6690
6695
6700
6705
6710
6715
6720
6725
6730
6735
6740
6745
6750
6755
6760
6765
6770
6775
6780
6785
6790
6795
6800
6805
6810
6815
6820
6825
6830
6835
6840
6845
6850
6855
6860
6865
6870
6875
6880
6885
6890
6895
6900
6905
6910
6915
6920
6925
6930
6935
6940
6945
6950
6955
6960
6965
6970
6975
6980
6985
6990
6995
7000
7005
7010
7015
7020
7025
7030
7035
7040
7045
7050
7055
7060
7065
7070
7075
7080
7085
7090
7095
7100
7105
7110
7115
7120
7125
7130
7135
7140
7145
7150
7155
7160
7165
7170
7175
7180
7185
7190
7195
7200
7205
7210
7215
7220
7225
7230
7235
7240
7245
7250
7255
7260
7265
7270
7275
7280
7285
7290
7295
7300
7305
7310
7315
7320
7325
7330
7335
7340
7345
7350
7355
7360
7365
7370
7375
7380
7385
7390
7395
7400
7405
7410
7415
7420
7425
7430
7435
7440
7445
7450
7455
7460
7465
7470
7475
7480
7485
7490
7495
7500
7505
7510
7515
7520
7525
7530
7535
7540
7545
7550
7555
7560
7565
7570
7575
7580
7585
7590
7595
7600
7605
7610
7615
7620
7625
7630
7635
7640
7645
7650
7655
7660
7665
7670
7675
7680
7685
7690
7695
7700
7705
7710
7715
7720
7725
7730
7735
7740
7745
7750
7755
7760
7765
7770
7775
7780
7785
7790
7795
7800
7805
7810
7815
7820
7825
7830
7835
7840
7845
7850
7855
7860
7865
7870
7875
7880
7885
7890
7895
7900
7905
7910
7915
7920
7925
7930
7935
7940
7945
7950
7955
7960
7965
7970
7975
7980
7985
7990
7995
8000
8005
8010
8015
8020
8025
8030
8035
8040
8045
8050
8055
8060
8065
8070
8075
8080
8085
8090
8095
8100
8105
8110
8115
8120
8125
8130
8135
8140
8145
8150
8155
8160
8165
8170
8175
8180
8185
8190
8195
8200
8205
8210
8215
8220
8225
8230
8235
8240
8245
8250
8255
8260
8265
8270
8275
8280
8285
8290
8295
8300
8305
8310
8315
8320
8325
8330
8335
8340
8345
8350
8355
8360
8365
8370
8375
8380
8385
8390
8395
8400
8405
8410
8415
8420
8425
8430
8435
8440
8445
8450
8455
8460
8465
8470
8475
8480
8485
8490
8495
8500
8505
8510
8515
8520
8525
8530
8535
8540
8545
8550
8555
8560
8565
8570
8575
8580
8585
8590
8595
8600
8605
8610
8615
8620
8625
8630
8635
8640
86

Um die Bindung von Bakterien an p12 zu untersuchen, wurde biotinyliertes p12 auf Streptavidin-Chips immobilisiert und verschiedene *E. coli* Stämme injiziert. Die Bakterien wurden für die Messungen in PBS aufgenommen. Es wurden *E. coli* Stämme verwendet, die Lipopolysaccharide mit unterschiedlichen Polysaccharid-Anteilen besitzen. Der Polysaccharidteil besteht aus einer „Herz“-Region, die mit dem Lipid A verknüpft ist und dem sogenannten O-Antigen. Das O-Antigen variiert sehr stark zwischen verschiedenen Bakterienarten und auch Bakterienstämmen, während die „Herz“-Region stark konserviert ist. Stämme, die die „Herz“-Region und O-Antigen (z.B. *E. coli*), sowie Stämme die eine vollständige „Herz“-Region (*E. coli* D21) besitzen würden von p12 gebunden, während Stämme mit einem stark verkürzten „Herz“-Region (z.B. *E. coli* D21f2) nicht mehr von p12 erkannt würden (Fig. 6C). Die Bindung konnte durch EDTA (5 mM) wieder gelöst und der Chip regeneriert werden.

15 Beispiel 13: rekombinante p12-Konstrukte

1 Konstruktion von p12 mit N-terminalem Strep-Tag (N-Strep-p12): Mittels PCR wurde an das 5'-Ende des T4p12-Gens die Nukleotidsequenz für den Strep-Tag (US patent 5,506,121) eingeführt. Hierfür wurde für das 5'-Ende des p12-Gens ein Primer konstruiert (5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:1), der die Nukleotidsequenz des Strep-Tags an seinem 5'-Ende beinhaltet (kursiv in der Sequenz) und eine Restriktionsschnittstelle (*NdeI*, unterstrichen in der Sequenz) derart besitzt, dass das Gen im richtigen Leseraster in das Expressionsplasmid eingesetzt werden kann. Für das 3'-Ende des p12-Gens wurde ein Primer konstruiert, der hinter dem p12-Gen eine *BamH I* Restriktionsschnittstelle (kursiv in der Sequenz) einführt (5'-ACG CGC AAA GCT TGT CGA CGG ATC CTA TCA TTC TAC CTT AAT TAT GTA GTT-3'), (SEQ ID NO:2). Die PCR wurde mit 40 Cyclen (1 min 95°C, 1 min 45°C und 1 min 72°C) durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und das gewünschte Fragment nach Größenfraktionierung über ein Agarosegel und Elution aus dem Gel in die *NdeI* und *BamHI* site des Expressionsplasmids pET21a eingesetzt. Die Sequenz des N-Strep-p12-Gens wurde über DNA-Sequenzierung auf seine Richtigkeit hin überprüft. Die weiteren Schritte zum Plasmid pNS-T4p12p57 wurden wie von Burda, M.R. & Miller, S. (Eur J Biochem. 1999 265 (2), 771-778) für T4p12p57 beschrieben durchgeführt. Das Plasmid pNS-T4p12p57 wurde dann in den Expressionsstamm BL21 (DE3) transformiert.

2. Einfügen eines N-terminalen Cysteinrests in N-Strep-p12 (N-Strep-S3C-p12 und N-Strep-S14C-p12): Die Einfügung eines N-terminalen Cysteinrestes wurde wie unter 1. beschrieben durchgeführt, wobei dafür zwei neue Primer für das 5'-Ende konstruiert wurden. Für das N-Strep-S3C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT TGT TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC AGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT- 3' (SEQ ID NO:3), für das N-Strep-S14C-p12 wurde der Primer 5'-GAA GGA ACT AGT CAT ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA GGC GCC TGT AAT AAT ACA TAT CAA CAC GTT-3' (SEQ ID NO:4) verwendet.

10

3. Reinigung von N-Strep-p12 Protein: Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Plasmid pNS-T4p12p57 wurde in 2.1 Schüttelkulturen (LB-Medium mit Ampicillin 100 µg/ml) bis zu einer OD600 von 0.5-0.7 bei 37°C gezogen und die Expression des N-Strep-p12-Proteins wurde durch Zugabe von 1mM IPTG (Isopropyl-β-thio-galactopyranoside) induziert. Nach Inkubation bei 37°C für 4h wurden die Zellen abgeerntet. Geerntete Zellen aus 10 l Kultur wurden in 50 ml Natriumphosphat, 20 mM pH 7.2, 2 mM MgSO4, 0.1 M NaCl aufgenommen, durch dreimalige French-Press-Behandlung (20.000 psi) aufgebrochen und anschließend 30 min bei 15.000 rpm (SS34) abzentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen im gleichen Puffer wurde das N-Strep-p12 Protein aus dem Pellet das Pellet 3x mit durch Rühren für 30 min in 40 mM TrisHCl pH 8.0, 10 mM EDTA extrahiert, der Ansatz für 30 min bei 15.000 rpm (SS34) zentrifugiert und das abgelöste NS-p12 im Überstand bei 4°C gelagert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. und die vereinigten Überstände wurden auf eine Streptactin-Affinitätssäule (15 ml), äquilibriert mit Puffer „W“ (100 mM TrisHCl pH 8, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl), aufgetragen (IBA GmbH, Göttingen). Nach Waschen mit 5 Säulenvolumina Puffer „W“ wurde mit 3 Volumina Puffer „W“ mit 2.5 mM Desthiobiotin in Puffer „W“ eluiert. Nach mehrmaliger Dialyse gegen Puffer „W“ und Aufkonzentration wurde über SDS-PAGE und UV-Spektroskopie (Burda et.al. 1999) die Konzentration und Reinheit von N-Strep-T4p12 ermittelt. Aus 10 Liter Kultur wurden so ca. 100 mg N-Strep-T4p12 gereinigt.

Name	Sequenz des Tag	
Nstrep-p12	MASWSH P QFEKGAS	SEQ ID NO:5
Nstrep-p12-S3C	MACWSH P QFEKGAS	SEQ ID NO:6
Nstrep-p12-S14C	MASWSH P QFEKGAC	SEQ ID NO:7

SEQUENCE LISTING

5 <110> PROFOS AG

10 <130> PRO-008/1

15 <140> unknown

20 <141> 2003-02-24

25 <160> 8

30 <170> PatentIn version 3.1

20

25 <210> 1

30 <211> 78

35 <212> DNA

40 <213> künstlich hergestellte Sequenz

25

45 <400> 1

50 gaaggaacta gtcatatggc tagctggagc caccggcagt tcgaaaaagg cgccagtaat

60

55 <400> 2

60 aatacatatc aacacgtt

78

75 <210> 2

80 <211> 54

85 <212> DNA

90 <213> künstlich hergestellte Sequenz

85 <400> 2

90 acgcgc当地 gttgtcgacg gatccttatca ttcttttacc ttaattatgt agtt

54

95 <210> 3

100 <211> 78

105 <212> DNA

55 <213> künstlich hergestellte Sequenz

60 <400> 3

gaaggaaacta gtcataatggc ttgttggagc caccgcagt tcgaaaaagg cgccagtaat 60

65

aatacatatc aacacgtt 78

80 <210> 4

85 <211> 78

90 <212> DNA

95 <213> künstlich hergestellte Sequenz

100 <400> 4

105 gaaggaaacta gtcataatggc tagctggagc caccgcagt tcgaaaaagg cgccctgtaat 60

110 aatacatatc aacacgtt 78

115 <210> 5

120 <211> 19

125 <212> PRT

130 <213> künstlich hergestellte Sequenz

135 <400> 5

140 Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn

145 1

150 5

155 10

160 15

170 Thr Tyr Gln

175 30

180 <210> 6

185 <211> 19

190 <212> PRT

195 <213> künstlich hergestellte Sequenz

200 <400> 6

205 Met Ala Cys Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn

210 1

215 5

220 10

225 15

230 Thr Tyr Gln

235 40

<210> 7

<211> 19

5 <212> PRT

<213> künstlich hergestellte Sequenz

<400> 7

10 Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Cys Asn Asn
1 5 10 15

Thr Tyr Gln

<210> 8

<211> 539

<212> PRT

<213> künstlich hergestellte Sequenz

20

<400> 8

Met Ala Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Ala Ser Asn Asn
1 5 10 1525 Thr Tyr Gln His Val Ser Asn Glu Ser Arg Tyr Val Lys Phe Asp Pro
20 25 30Thr Asp Thr Asn Phe Pro Pro Glu Ile Thr Asp Val Gln Ala Ala Ile
35 40 4530 Ala Ala Ile Ser Pro Ala Gly Val Asn Gly Val Pro Asp Ala Ser Ser
50 55 60Thr Thr Lys Gly Ile Leu Phe Leu Ala Thr Glu Gln Glu Val Ile Asp
35 65 70 75 80Gly Thr Asn Asn Thr Lys Ala Val Thr Pro Ala Thr Leu Ala Thr Arg
85 90 9540 Leu Ser Tyr Pro Asn Ala Thr Glu Ala Val Tyr Gly Leu Thr Arg Tyr
100 105 110

Ser Thr Asp Asp Glu Ala Ile Ala Gly Val Asn Asn Glu Ser Ser Ile

115 120 125

Thr Pro Ala Lys Phe Thr Val Ala Leu Asn Asn Val Phe Glu Thr Arg

130 135 140

5 Val Ser Thr Glu Ser Ser Asn Gly Val Ile Lys Ile Ser Ser Leu Pro

145 150 155 160

10 Gln Ala Leu Ala Gly Ala Asp Asp Thr Thr Ala Met Thr Pro Leu Lys

165 170 175

Thr Gln Gln Leu Ala Val Lys Leu Ile Ala Gln Ile Ala Pro Ser Lys

180 185 190

Asn Ala Ala Thr Glu Ser Glu Gln Gly Val Ile Gln Leu Ala Thr Val

195 200 205

20 Ala Gln Ala Arg Gln Gly Thr Leu Arg Glu Gly Tyr Ala Ile Ser Pro

210 215 220

20 Tyr Thr Phe Met Asn Ser Thr Ala Thr Glu Glu Tyr Lys Gly Val Ile

225 230 235 240

25 Lys Leu Gly Thr Gln Ser Glu Val Asn Ser Asn Asn Ala Ser Val Ala

245 250 255

Val Thr Gly Ala Thr Leu Asn Gly Arg Gly Ser Thr Thr Ser Met Arg

260 265 270

30 Gly Val Val Lys Leu Thr Thr Ala Gly Ser Gln Ser Gly Gly Asp

275 280 285

Ala Ser Ser Ala Leu Ala Trp Asn Ala Asp Val Ile His Gln Arg Gly

290 295 300

35

Gly Gln Thr Ile Asn Gly Thr Leu Arg Ile Asn Asn Thr Leu Thr Ile

305 310 315 320

Ala Ser Gly Gly Ala Asn Ile Thr Gly Thr Val Asn Met Thr Gly Gly

40 325 330 335

Tyr Ile Gln Gly Lys Arg Val Val Thr Gln Asn Glu Ile Asp Arg Thr

340

345

350

Ile Pro Val Gly Ala Ile Met Met Trp Ala Ala Asp Ser Leu Pro Ser

355

360

365

5

Asp Ala Trp Arg Phe Cys His Gly Gly Thr Val Ser Ala Ser Asp Cys

370

375

380

10

Pro Ileu Tyr Ala Ser Arg Ile Gly Thr Arg Tyr Gly Gly Ser Ser Ser

385

390

395

400

Asn Pro Gly Leu Pro Asp Met Arg Gly Leu Phe Val Arg Gly Ser Gly

405

410

415

Arg Gly Ser His Leu Thr Asn Pro Asn Val Asn Gly Asn Asp Gln Phe

420

425

430

Gly Lys Pro Arg Leu Gly Val Gly Cys Thr Gly Gly Tyr Val Gly Glu

435

440

445

20

Val Gln Lys Gln Gln Met Ser Tyr His Lys His Ala Gly Gly Phe Gly

450

455

460

25

Glu Tyr Asp Asp Ser Gly Ala Phe Gly Asn Thr Arg Arg Ser Asn Phe

465

470

475

480

Val Gly Thr Arg Lys Gly Leu Asp Trp Asp Asn Arg Ser Tyr Phe Thr

485

490

495

30

Asn Asp Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Ala Ser Gln Arg Asn Ser Arg Tyr

500

505

510

Thr Leu Asn Arg Pro Glu Leu Ile Gly Asn Glu Thr Arg Pro Trp Asn

515

520

525

35

Ile Ser Leu Asn Tyr Ile Ile Lys Val Lys Glu

530

535

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Endotoxin, umfassend die Schritte:
 - a) Inkubieren einer Probe mit einem Bakteriophagenschwanzprotein,
 - b) Nachweis von an Bakteriophagenschwanzproteine gebundenes Endotoxin.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gegebenenfalls ferner umfassend nach Schritt a) und vor Schritt b) den zusätzlichen Schritt
 - a') Abtrennung der Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexe von der Probe.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Nachweis mittels spektroskopischer Verfahren durchgeführt wird.
4. Verfahren zur Entfernung von Endotoxin aus einer Probe, umfassend die Schritte:
 - a) Inkubation oder in Kontakt bringen einer Probe mit Bakteriophagenschwanzproteinen, die unspezifisch oder gerichtet, an einem festen Träger immobilisiert sind,
 - b) Trennen des Bakteriophagenschwanzprotein-Endotoxin-Komplexes von der Probe.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die Schritte a) und b) in einem Chromatographiesäulen-Durchflussverfahren durchgeführt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der feste Träger Filtrationsmedien, Glaspartikel, Magnetpartikel, Zentrifugations-, Sedimentationsmaterialien oder Füllmaterialien für Chromatographiesäulen sind.
7. Verfahren nach Anspruch 4 bis 6, wobei die Bakteriophagenschwanzproteine über Kopplungsgruppen an dem festen Träger immobilisiert sind.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Kopplungsgruppe ein Lektin, Rezeptor oder

Anticalin ist.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Kopplungsgruppe ein Streptavidin oder Avidin ist und die Bakteriophagenschwanzproteine mit Biotin oder einem Strep-Tag gekoppelt sind.
- 5 10. Verfahren nach Anspruch 4 bis 6, wobei die Bakteriophagenschwanzproteine kovalent über chemische Bindungen an dem festen Träger immobilisiert sind.
- 10 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Bakteriophagenschwanzprotein einen Strep-Tag oder einen His-Tag aufweist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Tag eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO. 5, 6 oder 7 aufweist.
- 15 13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei als Bakteriophagenschwanzprotein das p12-Protein des Phagen T4 verwendet wird.
- 20 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ca^{2+} -Konzentration in der Inkubation 0,1 μM bis 10 mM und die Mg^{2+} -Konzentration 0,1 μM bis 10 mM beträgt.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei markiertes Endotoxin aus der Bindung mit einem Bakteriophagenschwanzprotein verdrängt wird und das markierte Endotoxin anschließend nachgewiesen wird.

Fig. 1

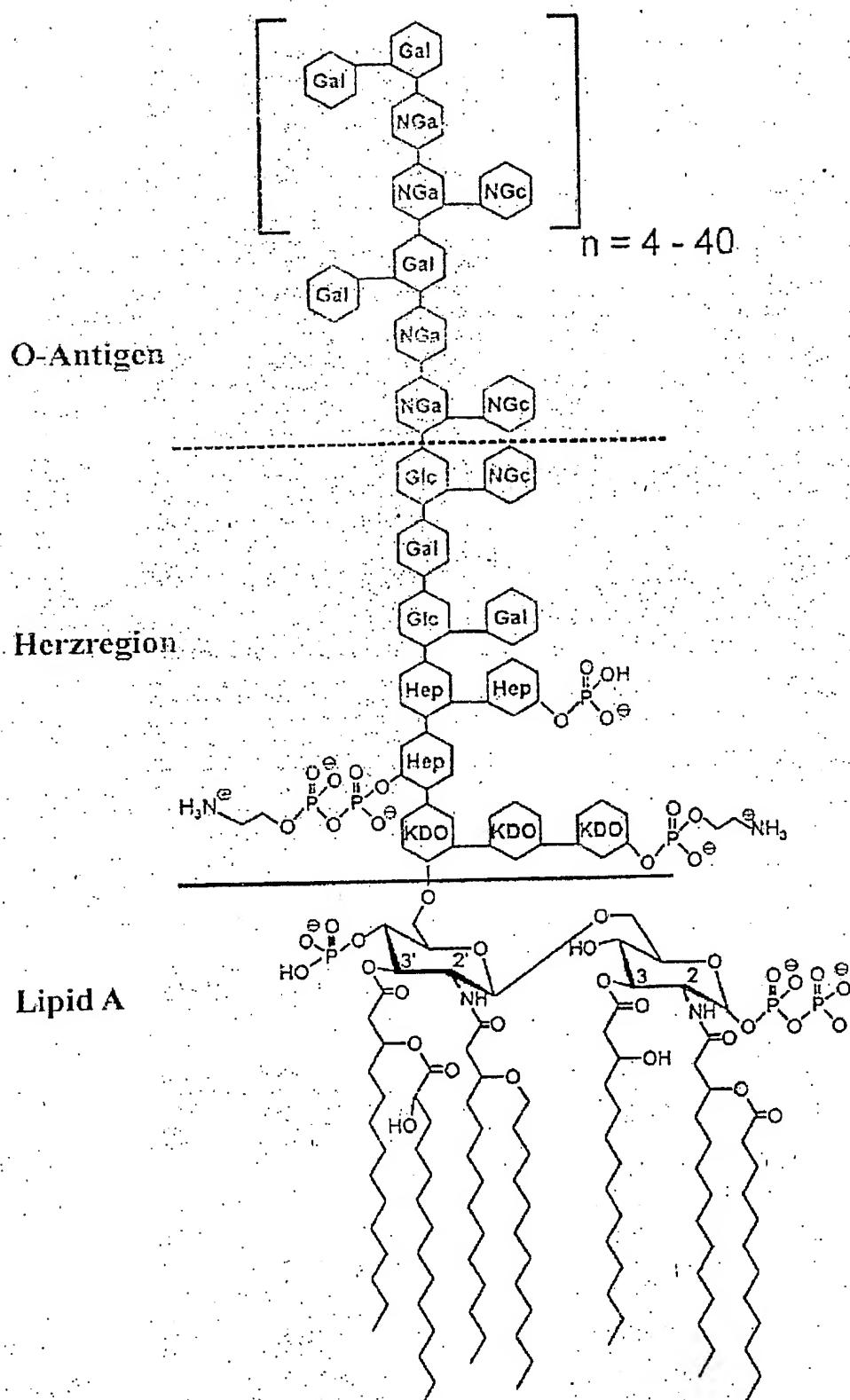
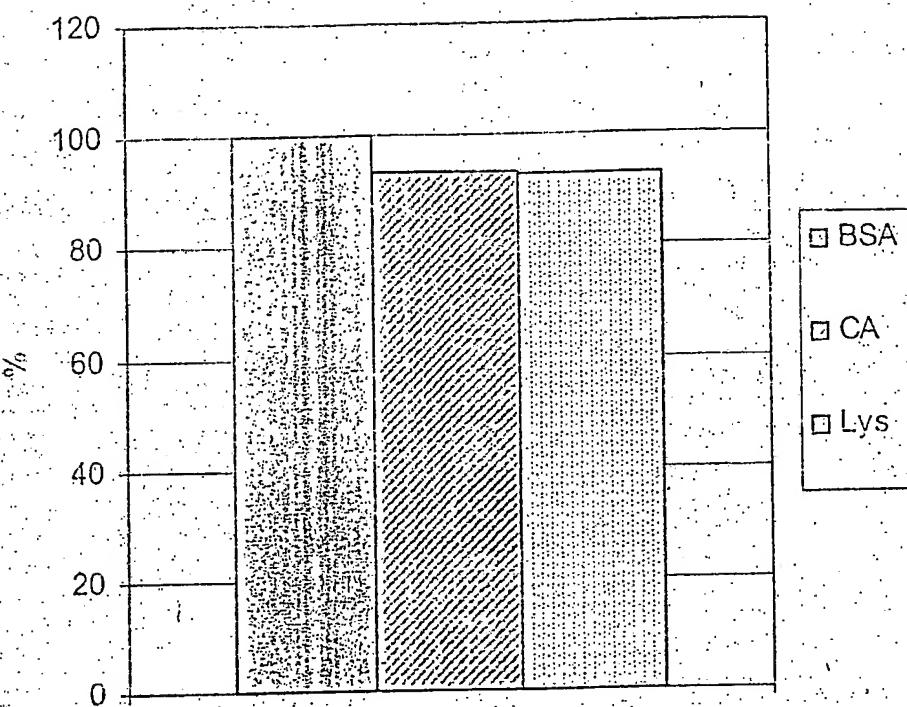


Fig. 2

A



B

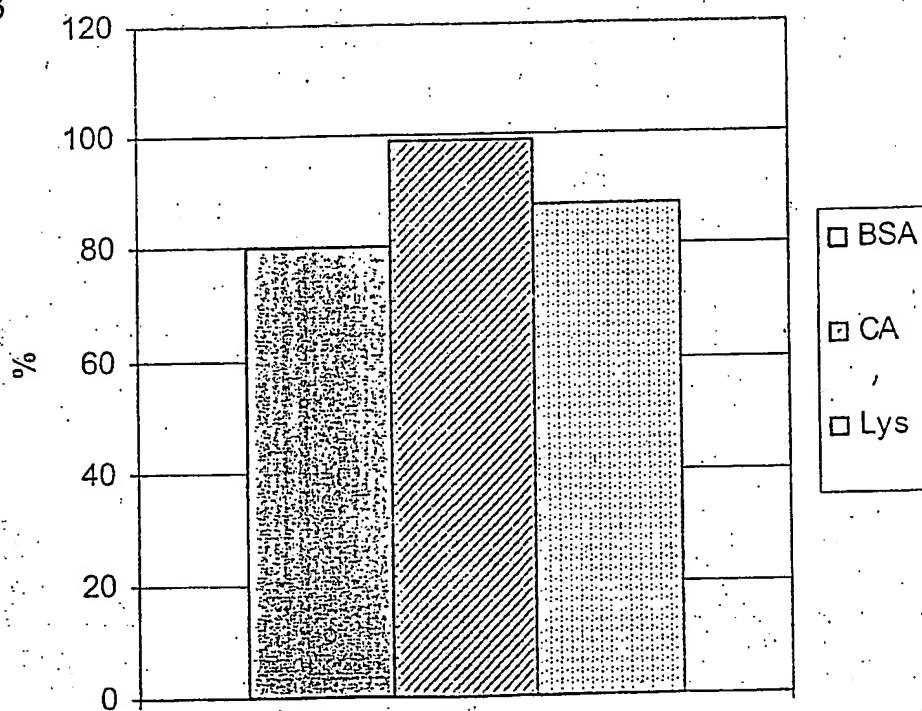
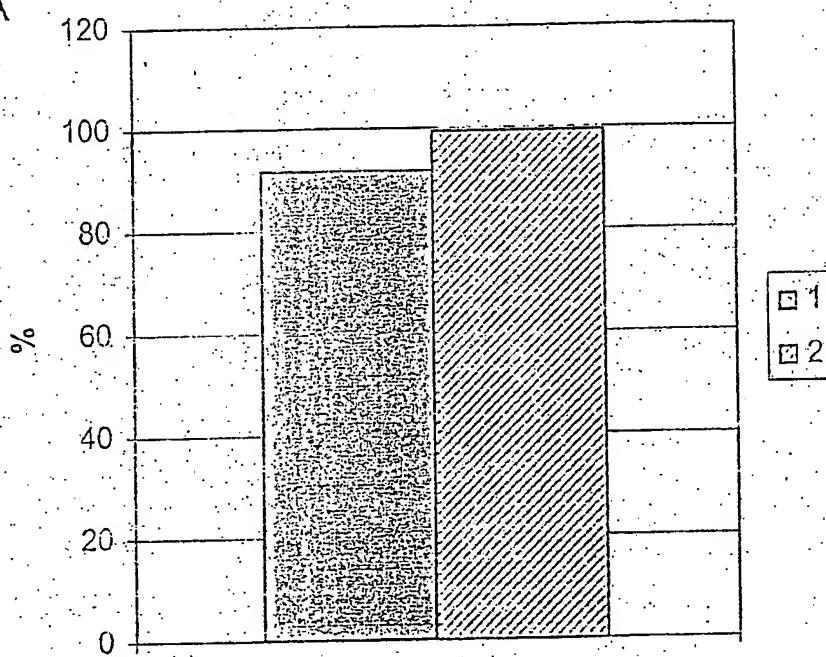


Fig. 3

A



B

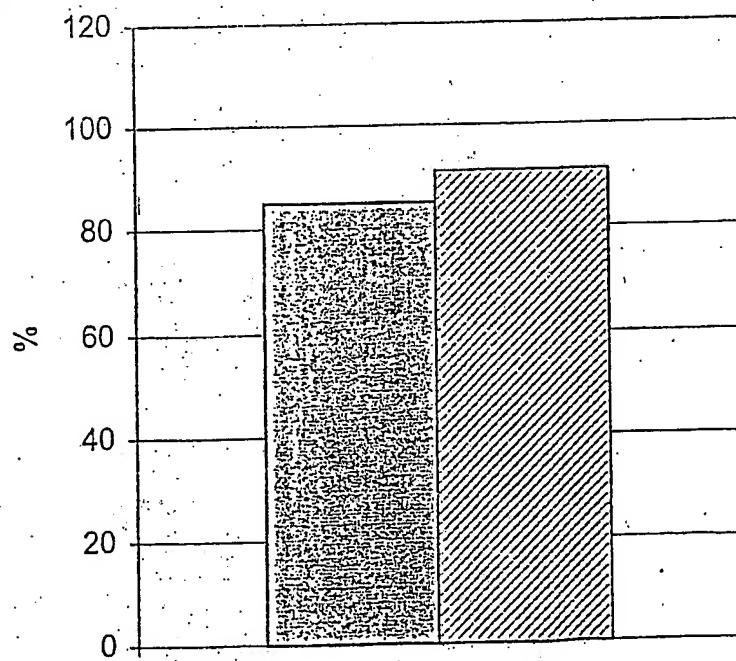
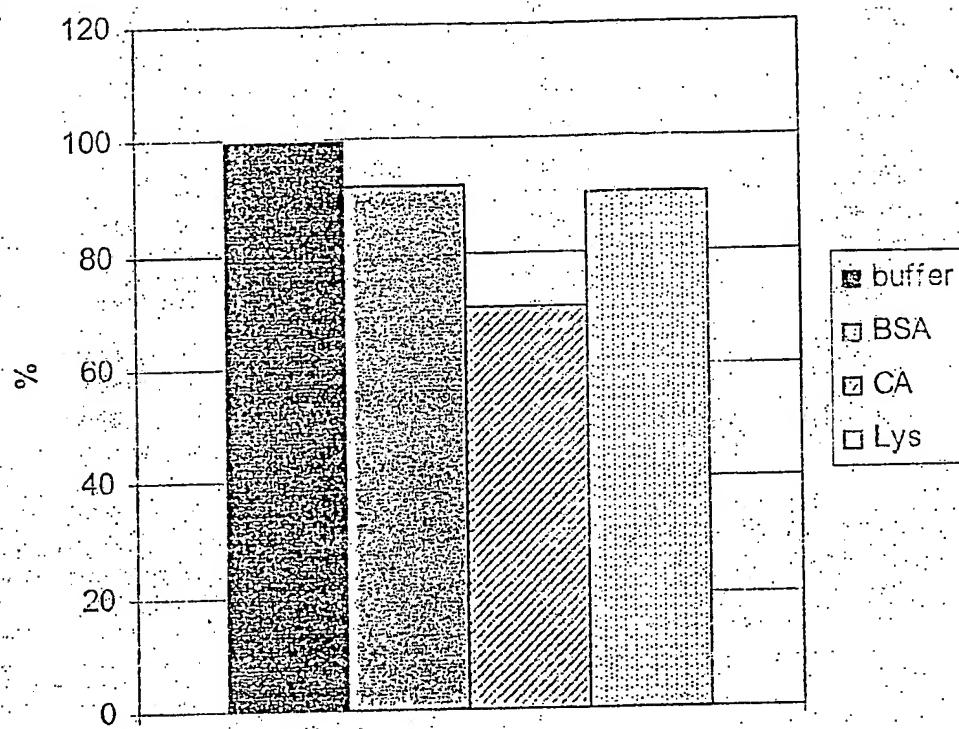
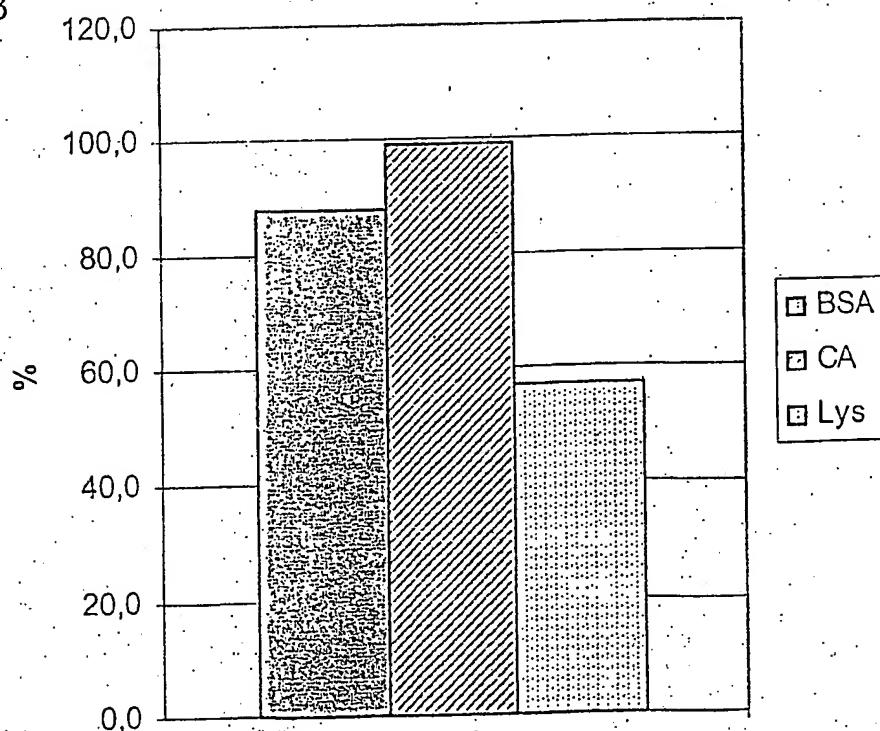


Fig. 4

A



B



419

Fig. 5

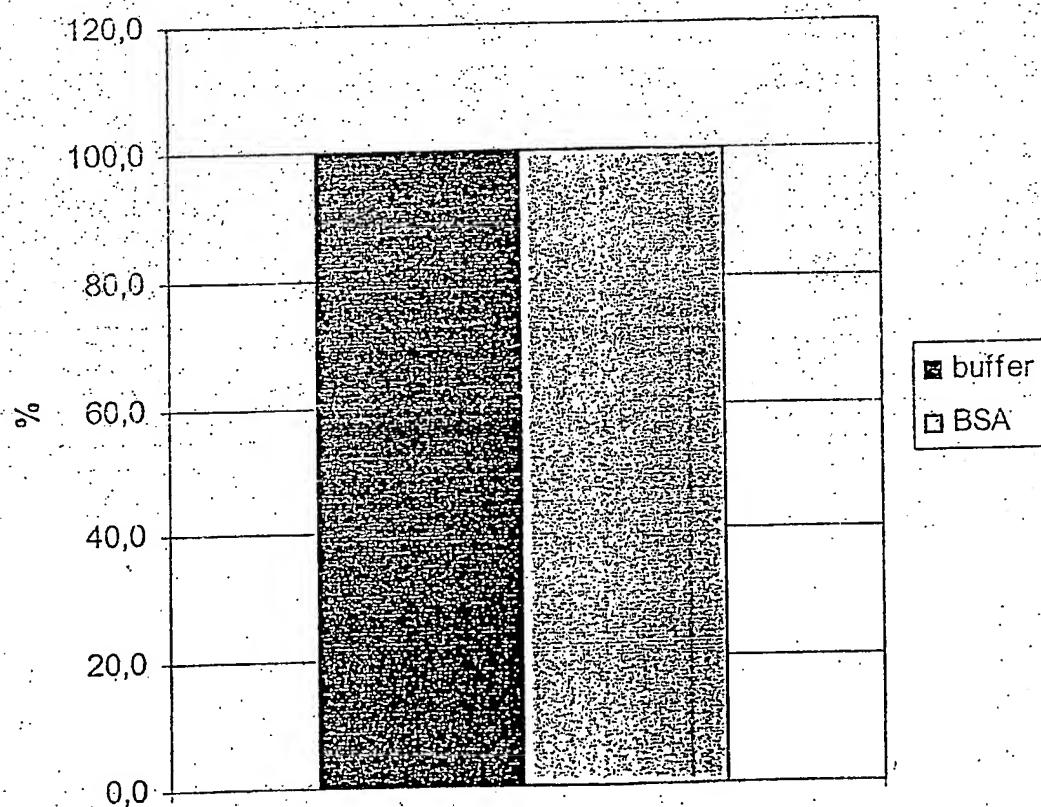
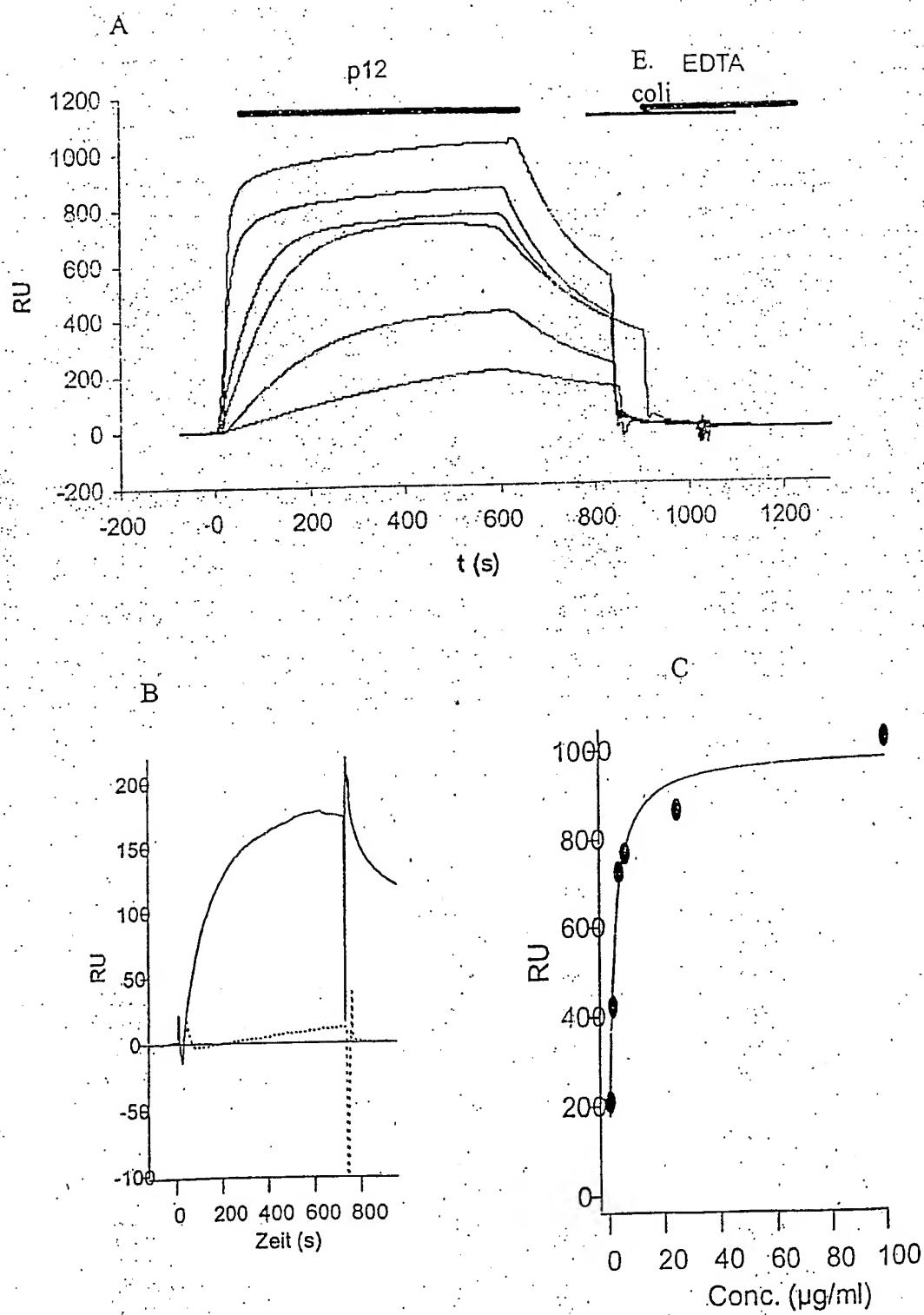


Fig. 6



Endotoxin-Struktur	<i>E. coli</i> Stamm	p12-Bindung
$ \begin{array}{c} \text{KDO-LipidA} \\ \\ \text{KDO} \\ \\ \text{KDO} \end{array} $	D21f2	-
$ \begin{array}{c} \text{Hep-Hep-KDO-LipidA} \\ \\ \text{Hep} \quad \text{KDO} \\ \\ \text{KDO} \end{array} $	D21f1	+
$ \begin{array}{c} \text{Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA} \\ \quad \\ \text{Hep} \quad \text{KDO} \\ \\ \text{KDO} \end{array} $	D21e8	+
$ \begin{array}{c} \text{Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA} \\ \quad \quad \\ \text{Gal} \quad \text{Hep} \quad \text{KDO} \\ \\ \text{KDO} \end{array} $	D21e7	+
$ \begin{array}{c} \text{GlcN-Glc-Glc-Glc-Hep-Hep-KDO-LipidA} \\ \quad \quad \quad \\ \text{Gal} \quad \text{Hep} \quad \text{KDO} \\ \\ \text{KDO} \end{array} $	D21	+

pH	K_d
6,0	3,09 E-07
7,5	6,85 E-08
8,0	5,86 E-08
8,5	7,86 E-08
9,0	3,29 E-08
10,0	1,55 E-07

Fig. 7

Fig. 8

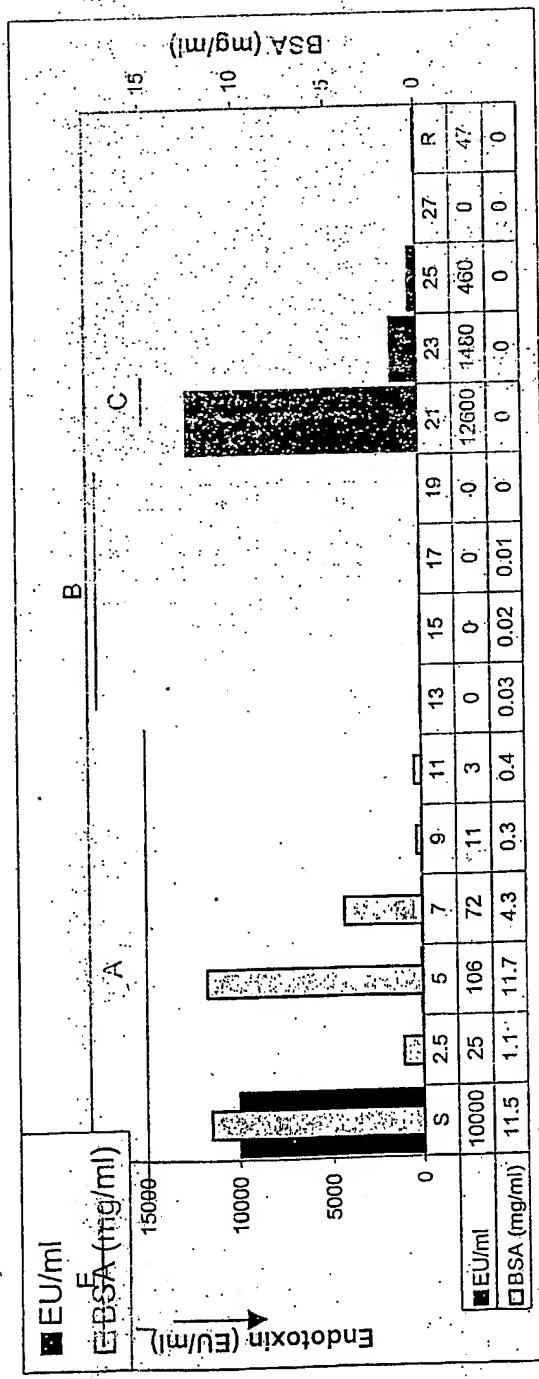


Fig. 9:

